

Université de Montréal

Le stress oxydatif d'origine nutritionnelle en période néonatale chez le cochon d'Inde et son impact à l'âge adulte sur l'homéostasie redox, le métabolisme énergétique et la méthylation génique

Par

Vitor Teixeira Nascimento

Département de nutrition, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (PhD) en nutrition

Juin 2023

© Teixeira Nascimento, 2023

Université de Montréal

Unité académique : département de nutrition, Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

Le stress oxydatif d'origine nutritionnelle en période néonatale chez le cochon d'Inde et son impact à l'âge adulte sur l'homéostasie redox, le métabolisme énergétique et la méthylation génique

Présenté par

Vitor Teixeira Nascimento

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Matthieu Ruiz

Président-rapporteur

Jean-Claude Lavoie

Directeur de recherche

Jean-François Bilodeau

Membre du jury

Diana Averill-Bates

Examinatrice externe

Résumé

Problématique : Durant la période fœtale, le métabolisme global du fœtus fonctionne en hypoxie, ce qui limite la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie, et par conséquent la production d'adénosine triphosphate (ATP). Ces conditions sont nécessaires pour le développement intra-utérin. Lors de la naissance, l'augmentation des concentrations d'oxygène et un stress oxydatif permettent une transition métabolique. Une charge oxydative supplémentaire en période néonatale pourrait perturber cette transition métabolique et causer des complications. La nutrition parentérale (NP) administrée aux nouveau-nés prématurés apporte un triple fardeau oxydatif : une exposition à des peroxydes oxydants autogénérés par l'interaction des composants de la NP, une carence en vitamine C (instable en solution), et une déficience en glutathion, vu la charge oxydative élevée. Cette charge oxydative excessive affecte l'homéostasie redox au foie et aux poumons, ainsi que le métabolisme énergétique hépatique, et ce, par des effets immédiats et à long-terme. La méthylation de l'ADN est un possible mécanisme qui explique les effets à long terme. Le but de ce travail était de caractériser l'impact à court- et long-terme de la NP néonatale sur l'homéostasie redox, la méthylation de l'ADN, et le métabolisme des glucides et lipides, en isolant chacun des facteurs nutritionnels.

Méthodes : Des cochons d'Inde ont été divisés dans les groupes suivants 1) NP : nutrition intraveineuse complète ; 2) NP+ glutathion disulfure (GSSG) (6 ou 12 μ M- substrat pour la synthèse intra-cellulaire de glutathion); 3) Diète complète : nutrition orale complète 4) Diète déficiente en Vitamine C; 5) Diète déficiente en Cystéine; 6) Diète double déficiente; ou. À 1 semaine de vie, la moitié des animaux était sacrifié et l'autre moitié a commencé à manger une diète complète jusqu'à l'âge adulte.

Résultats et discussion : Les animaux ayant reçu une NP néonatale ont un métabolisme énergétique permettant la synthèse de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) par l'augmentation de l'activité de la glucokinase (captation de glucose), et diminution de celles de la phosphofructokinase-1 (PFK-1) (glycolyse) et acétyl-CoA-carboxylase-1 (ACC)(lipogenèse). À l'âge adulte, les animaux ont une diminution des niveaux de GSSG, indiquant un débalancement de l'homéostasie redox vers le côté réducteur programmé par la NP néonatale. L'activité augmentée de l'ACC suggère une tendance à accumuler les lipides au foie à la suite d'une diète

riche en glucides. L'ajout de glutathion à la NP ne prévient pas ces perturbations, car les déficiences en glutathion et vitamine C jouent un rôle sur la modulation des niveaux protéiques de l'ACC.

Les diètes néonatales déficientes en vitamine C et cystéine augmentent l'activité de la PFK-1. Cette augmentation se maintient jusqu'à l'âge adulte chez les mâles, mais pas chez les femelles. Les niveaux protéiques de la glucokinase et ACC sont diminués à 1 semaine, et ceux de l'ACC sont élevés à 3 mois dans les groupes ayant reçu une des diètes déficientes. Ces effets sont similaires à ceux trouvés dans les animaux nourris avec la NP, suggérant que la déficience de la NP en ces nutriments et non les peroxydes cause ces effets.

Dans tous les groupes, un stress oxydatif a été démontré à 1 semaine de vie, soit par l'augmentation des niveaux de GSSG, ou la diminution du GSH. Cet effet est vrai pour le foie et le poumon. Une réponse de Nrf2 est observée aussi au foie, ce qui caractérise un niveau bas de stress oxydatif. La baisse de GSH pulmonaire chez les animaux déficients est secondaire à l'inhibition oxydative de la voie de transméthylation au foie. Une diminution des niveaux d'ARNm de glutathion réductase et glutarédoxine sont observées, ce qui favorise encore le stress oxydatif pulmonaire. À long terme, les effets sont les opposés, soit débalancement de l'homéostasie redox vers le côté réducteur au foie et poumon.

La méthylation de l'ADN était diminuée au foie des animaux nouveau-nés recevant les diètes déficientes, mais aucun changement n'a été observé aux poumons. Cette diminution est en accord avec les hauts niveaux d'ARNm des gènes de la protéine régulatrice de la glucokinase, et AMPK. À long-terme, l'effet inverse est observé pour la méthylation de l'ADN

Conclusion : La NP modifie le flot d'énergie au foie à 1 semaine visant favoriser le métabolisme redox en détriment du métabolisme énergétique. Cet effet semble créer une déficience énergétique fonctionnelle, qui se développe en une lipogenèse accrue en âge adulte. Cela peut représenter un exemple de la plasticité développementale. Bien qu'un stress oxydatif en âge néonatal ne soit pas létal, il affecte le métabolisme énergétique et redox à long-terme, probablement par la méthylation de l'ADN. Les résultats de ce travail démontrent que ces animaux adultes ont une capacité accrue d'entreposer de l'énergie, soit par une lipogenèse plus élevée, soit par une accumulation d'énergie redox (glutathion). Aucune maladie métabolique n'était observée chez les animaux, mais il est attendu à ce que ces animaux développent ces maladies plus facilement suite à l'exposition à des insultes (habitudes de vie malsaines, tabagisme, etc.).

Mots-clés : Glutathion, vitamine C, cystéine, peroxydes, nutrition parentérale, Origines Développementales de la Santé et des Maladies (ODSM), prématurité, glycolyse, lipogenèse, méthylation de l'ADN.

Abstract

Problematic: During the fetal period, the general metabolism works under hypoxia, limiting oxidative phosphorylation in mitochondria and adenine triphosphate (ATP) synthesis. These conditions are necessary for intrauterine development. After birth, the increasing oxygen concentrations and the associated oxidative stress induce a metabolic transition. An excessive oxidative load during the neonatal period could perturb this transition. Parenteral nutrition (PN) administered to premature newborns comes with a triple oxidative burden: contaminating peroxides generated in solution, vitamin C deficiency (unstable in solution), and glutathione deficiency (caused by the high oxidative load). This oxidative load affects redox homeostasis in the liver and lungs, as well as energy metabolism in the liver. These effects are not only immediate, but they are also delayed. DNA methylation is a candidate mechanism explaining the long-term effects. The objective of this work was to characterize the short- and long-term impacts of neonatal PN over redox homeostasis, DNA methylation and carbohydrate and lipid metabolism by isolating each of these factors.

Methods: Six groups of three-day-old guinea pigs received for 4 days either: 1) Total PN; 2) PN+glutathione disulfide (GSSG) (6 or 12 μ M-anti-peroxide);3) Vitamin C deficient; 4) Cysteine deficient; 5) Double deficient; or 6) Complete diets. At 1 week of life, half of the animals were sacrificed, and the other half started eating nutritionally complete diets until adulthood.

Results and discussion: NP animals had energy metabolism shifted favouring nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) synthesis, as evidenced by the increase in glucokinase activity (glucose trapping in hepatocytes) and decrease in phosphofructokinase-1 (PFK-1) (glycolysis) and acetyl-CoA-carboxylase-1 (ACC) (lipogenesis) activities. Adding GSSG to parenteral nutrition prevents these changes. During adulthood, ACC activity is increased, suggesting a tendency to accumulate lipids after a diet rich in carbohydrates. Adding GSSG to PN does not prevent these changes as they seem to be caused by the nutritional deficiencies in vitamin C and cysteine.

Neonatal diets deficient in vitamin C and cysteine increase PFK-1 activity. This increase is maintained until adulthood in males but not in females. Protein levels of glucokinase and ACC are

decreased at 1 week of life and ACC levels are increased at adulthood in deficient groups. These effects are like the ones observed in PN animals.

In all groups, oxidative stress is demonstrated in 1-week-old animals, either by an increase in GSSG levels, or a decrease in GSH. This is true for the liver and lungs. An Nrf2 response is also observed in the liver, suggesting a low level of oxidative stress. The decrease in lung GSH is secondary to the oxidative inhibition of the transmethylation pathway in the liver. Decreased levels of glutathione reductase and glutaredoxin mRNA levels are observed in lungs, favouring pulmonary oxidative stress. At adulthood, an imbalance in redox homeostasis towards a reducing state is observed in lungs and liver.

DNA methylation was decreased in the liver of deficient animals at 1-week, but no changes were observed in lungs. This decrease is in accordance with the decrease in mRNA levels of glucokinase regulatory protein and AMPK. At adulthood, the opposite effect was observed for DNA methylation.

Conclusion: Parenteral nutrition alters the energy flow in the liver of 1-week-old animals, favouring redox metabolism over energy metabolism. This effect seems to create a phenotype of functional energy deficiency which translates into an increased lipogenesis at adult age. This may be an example of developmental plasticity. Although neonatal oxidative stress is not lethal, it affects energy and redox metabolism at adulthood, probably through DNA methylation. The presented results demonstrate these animals have an increased capacity of storing energy, either through increased lipogenesis, or by an increase in redox energy accumulation (glutathione). No metabolic disease was observed. Although it would be expected that these animals would develop these diseases more easily after exposure to insults, such as unhealthy lifestyle habits, smoking, and others.

Keywords: Glutathione, vitamin C, cysteine, peroxides, parenteral nutrition, Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), glycolysis, lipogenesis, DNA methylation.

Table des matières

<i>Résumé</i>	3
<i>Abstract</i>	6
<i>Table des matières</i>	8
<i>Liste des tableaux</i>	11
<i>Liste des figures</i>	12
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	13
<i>Remerciements</i>	15
<i>Revue de littérature</i>	17
Développement	17
Développement hépatique.....	17
Développement pulmonaire.....	19
Prématurité	22
Épidémiologie de la prématurité.....	22
Complications de la prématurité.....	24
Nutrition néonatale	26
Nutrition parentérale néonatale.....	26
Vitamine C.....	29
Cystéine	34
Origines développementales de la santé et des maladies (ODSM - DOHaD)	37
Stress oxydatif	40
Glutathion	43
Signalisation redox	43
Relation entre le glutathion et la vitamine C	45
Métabolisme énergétique hépatique	46
Glucokinase	47
Phosphofructokinase-1	48

Cycle de Krebs et phosphorylation oxydative	48
Lipogenèse	50
Contrôle des voies métaboliques au foie	50
Épigénétique	52
Méthylation de l'ADN	52
Épigénétique et complications à long terme	52
Épigénétique, métabolisme énergétique et métabolisme redox	54
<i>Problématique</i>.....	57
<i>Hypothèse et objectifs</i>.....	59
Hypothèse.....	59
Objectif général	59
Objectifs spécifiques.....	59
<i>Méthodes</i>.....	60
Objectif 1.....	60
Objectif 2.....	62
Objectif 3.....	63
<i>Résultats</i>.....	64
Réponse à l'objectif 1 - Neonatal parenteral nutrition affects the metabolic flow of glucose in newborn and adult male Hartley guinea pigs' liver.....	64
Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 1	99
GSH et GSSG aux poumons.....	99
Conclusions générales de l'objectif 1.....	100
Réponse à l'objectif 2 - Neonatal Vitamin C and Cysteine Deficiencies Program Adult Hepatic Glutathione and Specific Activities of Glucokinase, Phosphofructokinase, and Acetyl-CoA Carboxylase in Guinea Pigs' Livers	101
Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 2	138
Méthylation globale de l'ADN hépatique.....	138
Activité de TET	139
Expression des gènes du métabolisme énergétique	141

Conclusions générales de l'objectif 2.....	144
Réponse à l'objectif 3 - Disturbances of the lung glutathione system in adult guinea pigs following neonatal vitamin C or cysteine deficiency.....	146
Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 3	176
Méthylation globale de l'ADN pulmonaire.....	176
Conclusions générales de l'objectif 3.....	176
<i>Discussion</i>.....	177
Sommaire des résultats et contribution à l'avancement des connaissances	177
Contribution de chaque facteur de la NP	179
Peroxydes.....	179
Déficience en vitamine C.....	180
Déficience en glutathion	182
Autres facteurs	183
Le paradoxe de la double déficience.....	184
Le NADPH à la source des complications hépatiques de la NP.....	186
L'expression génique et les niveaux de protéines au foie	187
Cadre conceptuel.....	188
Forces et limites	190
Perspectives futures	191
<i>Conclusion</i>	193
<i>Références bibliographiques</i>.....	194

Liste des tableaux

Tableau 1	Enzymes qui utilisent la vitamine C comme cofacteur et ses fonctions	32
Tableau 2	Classification des niveaux de stress oxydatif selon l'intensité, voies de signalisation activées, résultats et conséquences physiologiques.....	41
Tableau 3	Liste des amorces et leurs concentrations utilisées aux réactions de qPCR.....	141
Tableau 4	Attribution des effets de la nutrition parentérale aux peroxydes, déficience en vitamine C et déficience en cystéine	177

Liste des figures

Figure 1	Marquage histologique (hématoxyline, éosine) d'un lobule hépatique d'un cochon d'Inde nouveau-né.....	18
Figure 2	Marquage histologique (hématoxyline, éosine) d'un poumon d'un cochon d'Inde adulte	21
Figure 3	Fenêtres de développement de chaque organe	24
Figure 4	États d'ionisation et oxydation de l'acide ascorbique.....	31
Figure 5	Voies de transméthylation, transsulfuration, oxydation de la cystéine et synthèse du glutathion	35
Figure 6	Représentation graphique du concept d'incompatibilité développementale.....	39
Figure 7	Relation entre l'acide ascorbique, le glutathion et le NADPH.	45
Figure 8	Intégration des voies métaboliques étudiées.	55
Figure 9	Ligne du temps du protocole animal de l'objectif 1.....	61
Figure 10	Ligne du temps du protocole animal de l'objectif 2.....	63
Figure 11	GSH et GSSG aux poumons des animaux nourris par nutrition parentérale ajouté ou non en GSSG, à 16 semaines de vie.....	99
Figure 12	5-méthylcytosine hépatique chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.	139
Figure 13	Activité de TET au foie des animaux déficients en vitamine C et cystéine.....	140
Figure 14	Expression relative des gènes du métabolisme énergétique chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.....	143
Figure 15	5-méthylcytosine pulmonaire chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.	176

Liste des sigles et abréviations

5hmC	5-hydroxyméthylcytosine
5mC	5-méthylcytosine
AA	Acide ascorbique
ACC	Acétyl-CoA-carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGS	Acide gras synthase
AMPK	Protéine kinase activée par AMP
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
CDO	Cystéine dioxygénase
ChREBP	« Carbohydrate response element binding protein »
DBP	Dysplasie bronchopulmonaire
DHAA	Acide dehydroascorbique
DNMT	ADN-méthyltransférases
EROs	Espèces réactives d'oxygène
FoxA	« Forkhead box A »
GCK	Glucokinase
GCL	Glutamate-cystéine ligase
GCN2	« General control nonderepressible 2 »
GKR	Protéine régulatrice de la glucokinase
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRX	Glutarédoxine
GS	Glutathion synthase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène

HIF-1a	Facteur induit par hypoxie
HNF	« Hepatocyte nuclear factor »
HSP	Protéine de choc thermique
IMC	Indice de masse corporelle
Keap1	« Kelch-like ECH- associated protein 1 »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinases »
MAT	Méthionine-adénosyltransférase
mTOR	« Mammalian target of rapamycin »
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
NOX	NADPH oxydase
Nrf2	« Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 »
ODSM	Origines développementales de la Santé et des Maladies
ONOO ⁻	Peroxynitrite
P-S ⁻	Résidu de cystéine thiolate
P-SH	Résidu de cystéine thiol
P-SNO	Résidu de cystéine nitrosylé
P-SO ₂ H	Résidu de cystéine acide sulfinique
P-SO ₃ H	Résidu de cystéine acide sulfonique
P-SOH	Résidu de cystéine acide sulfénique
P-SSG	Résidu de cystéine glutathionylé
P-SS-P	Pont disulfure entre deux protéines
PFK-1	Phosphofructokinase
PP2A	Protéine phosphatase 2A
SOD	Superoxyde dismutase
SREBP-1c	« Sterol regulatory element binding protein-1c »
TET	« Ten-eleven translocation enzyme »
TGF- β	Facteur de croissance transformant beta
TRX	Thiorédoxine
VPP	Voie de pentoses-phosphate
XO	Xanthine oxydase

Remerciements

Je tiens à remercier premièrement Jean-Claude Lavoie, non seulement pour l'opportunité de pouvoir travailler avec toi, mais également pour les innombrables leçons apprises durant ces années et pour être un modèle de professeur et superviseur. Merci d'avoir été toujours compréhensif et de me soutenir dans toutes les décisions et demandes. Un énorme merci.

Je remercie aussi Angela et Nadine pour toutes les discussions scientifiques, mais surtout la belle ambiance que vous avez créée au laboratoire. Vous avez fait de ce chemin difficile du doctorat beaucoup plus facile par l'amélioration de chacune de mes journées. À Clémence, Thérèse, Ibrahim pour tout l'apprentissage que vous m'avez transmis et le soutien dans tout mon parcours. J'ai apprécié vous côtoyer et je ne serais pas le scientifique que je suis sans vous. Je remercie aussi les professeurs et professeures du département de nutrition, ainsi que le personnel administratif. Mon engagement auprès du département était une réalisation personnelle très enrichissante et vous avez rendu l'expérience beaucoup plus agréable. Je remercie aussi Danielle Góes da Silva, ma première directrice de recherche, qui m'a donné mes premières opportunités et mes premiers outils de recherche que j'utilise jusqu'aujourd'hui. Merci à tous et toutes!

Personnellement, je remercie mon copain, Gabriel, pour tout son soutien moral, sa patience et sa compréhension. Tu as écouté toutes mes frustrations, tu as célébré toutes mes victoires et tu m'as donné la motivation pour continuer. Je dois remercier aussi aux premières personnes qui ont cru en moi: ma mère, Lídia, et mes sœurs Sara et Liz. Votre soutien date de plusieurs années, que ce soit en me motivant à continuer ou juste en m'aidant dans les périodes plus difficiles. Je ne peux pas oublier ma grande famille non plus. Toutes mes tantes et cousines, notamment Tia Ruth, Tia Ana, Margareth et Elisabeth. Vous m'avez enseigné l'importance de la confiance en soi même et vous n'avez jamais douté de moi. Je suis éternellement reconnaissant de votre soutien. J'ai la meilleure famille au monde!

Je remercie mes amis et amies qui m'ont toujours encouragé et ont cru en moi avant même que je commence mes études, spécialement Manu, Izadora, Marcela et Eduardo, ainsi que tous les amis que j'ai faits durant mes années d'études, notamment Mariana, Joy et Arnaud. Je suis très chanceux de vous avoir proche!

Enfin, je tiens à remercier aux membres du jury d'avoir accepté la tâche d'évaluation de la thèse.
Bonne lecture :)

Revue de littérature

Développement

Développement hépatique

Le foie est l'organe central du métabolisme énergétique, du métabolisme des substances xénobiotique et il exerce aussi des fonctions endocrines et exocrines. Il se développe à partir de l'endoderme à partir de la 3^e semaine de gestation jusqu'à la fin de la première année de vie postnatale, bien que son développement structural finisse au 2^e mois de vie postnatale (1).

Le développement structurel du foie commence par la phase de spécification, où un groupe de cellules de l'endoderme génère des cellules du système hépatobiliaire par la coordination des facteurs de transcription « *forkhead box A* » (FoxA), « *hepatocyte nuclear factor* » (HNF) et GATA4 (2). Ensuite, l'étape de morphogénèse permet la transformation de ces cellules en hépatoblastes par l'action des facteurs de transcription Sox17 et Hes1 (3). Les hépatoblastes sont les cellules précurseurs des hépatocytes et des cholangiocytes, les types cellulaires fonctionnels du foie et des voies biliaires, respectivement. La dernière étape du développement structurel est la différenciation des hépatoblastes. Cette étape est cruciale pour les fonctions hépatiques, car elle définit les rôles de chacune des cellules par leur emplacement dans le lobule hépatique. Des signaux provenant de la veine porte induisent la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes, qui, par la suite, formeront les canicules biliaires proches de la veine porte. Les hépatoblastes non stimulés par ces signaux généreront les hépatocytes (4,5).

Cette différenciation basée sur l'emplacement cellulaire permet le développement des lobules hépatiques, l'unité fonctionnelle du foie (Figure 1). Ces lobules ont des structures hexagonoïdes composées principalement des hépatocytes placés autour d'une veine centrale. Distalement de la veine centrale, se trouve la triade, composé de la veine porte, des canicules biliaires, et de l'artère hépatique. Cet emplacement crée un gradient d'oxygène, nutriments et substances xénobiotiques dans le lobule qui permet la spécialisation des hépatocytes périportaux dans les fonctions métaboliques et les hépatocytes centraux dans les fonctions endocrines et exocrines (6).

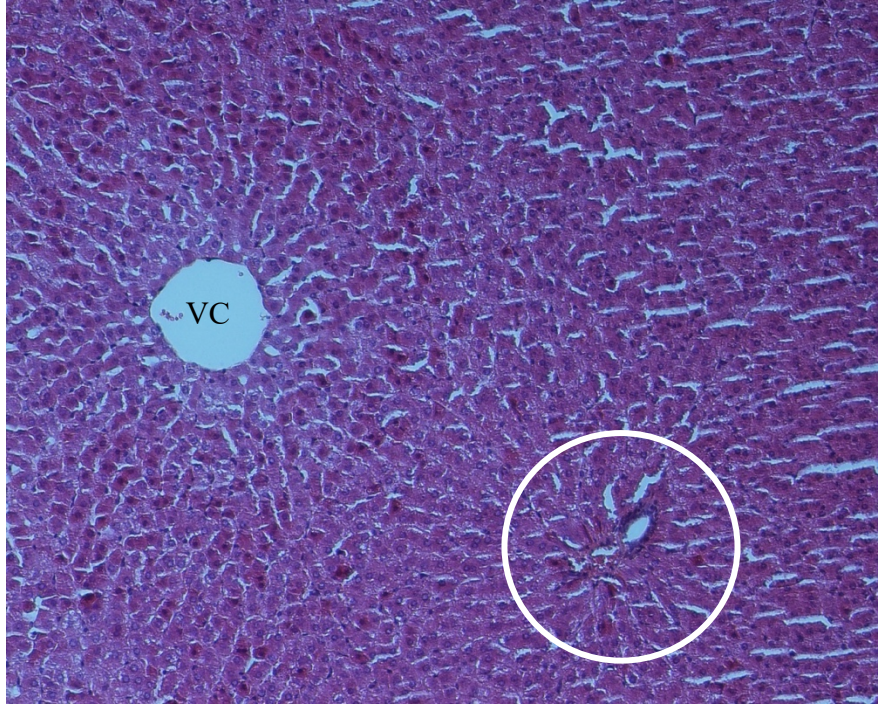


Figure 1 Marquage histologique (hématoxyline, éosine) d'un lobule hépatique d'un cochon d'Inde nouveau-né.

Au centre gauche, la veine centrale (VC) peut être observée. Au coin inférieur droit, la triade, formée de l'artère hépatique, la veine porte et le canicule biliaire, est à l'intérieur du cercle blanc.

Puisque durant la grossesse, l'apport en nutriments et oxygène aux tissus fœtaux provient de la mère, le foie fœtal n'exerce pas toutes ses fonctions de contrôle métabolique. Les faibles concentrations d'oxygène (20-25 mmHg O₂) permettent la stabilisation du facteur induit par hypoxie (HIF-1 α). Ce facteur de transcription stimule la transcription de gènes impliqués dans la vascularisation hépatique et la stimulation des voies de génération d'énergie indépendantes de l'oxygène, comme la glycolyse (7-9). Cependant, à ce stade, l'énergie métabolisée par le foie sert principalement à sa propre croissance, ainsi que pour l'hématopoïèse.

Lors de la naissance, trois facteurs déclenchent le changement métabolique observé au foie : 1) une augmentation des concentrations d'oxygène de 20-25 mmHg O₂ à 100 mmHg O₂, qui promeut l'activation des enzymes prolyl-hydroxylases qui hydroxylent et induisent la dégradation du

facteur de transcription HIF-1 α (9). Les concentrations d'oxygène plus élevées permettent aussi la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie, ainsi que la réduction partielle de l'oxygène. Ainsi, les niveaux des espèces réactives d'oxygène (EROs) s'élèvent au foie, qui à leur tour, permettent la transition métabolique vers un métabolisme néonatal; 2) la fermeture du conduit veineux : Ce conduit permet, durant la période anténatale, l'apport de nutriments et d'oxygène directement à la veine cave et à la circulation systémique sans un passage hépatique. Lors des premiers jours de vie, le conduit veineux ferme, et la veine porte assume le rôle d'apport de nutriments. Tandis que le conduit veineux apporte du sang du placenta, la veine porte apporte le sang provenant directement des intestins. Les nutriments, microorganismes, cellules et toxines provenant de l'alimentation et du microbiote intestinal, stimulent une transition métabolique hépatique permettant la métabolisation de nutriments, les fonctions immunologiques et d'inactivation de substances xénobiotiques (10,11); 3) un apport intermittent de nutriments: Durant la grossesse, les nutriments sont apportés par la veine ombilicale en continu, principalement sous forme de glucose et acides aminés. Après la naissance, les nutriments proviennent de l'alimentation de manière intermittente. Le foie, en tant que régulateur métabolique, contrôle les niveaux de ces nutriments dans la circulation systémique. Il exerce ce rôle par l'activation des voies anaboliques lors des périodes d'alimentation et des voies cataboliques lors de périodes de jeûne (6,11).

Durant la grossesse, la voie métabolique prédominante est la glycolyse. Les niveaux d'hexokinase et de phosphofructokinase (PFK-1) élevées au foie fœtal sont une démonstration de cette prédominance. Dans les jours qui suivent la naissance, les niveaux de phosphoenolpyruvate carboxykinase, de pyruvate carboxylase, de glucose 6-phosphate déshydrogénase, et d'acétyl-CoA carboxylase (ACC) augmentent rapidement. Ces enzymes contrôlent la gluconéogenèse, le cycle de Krebs, la voie de pentoses phosphate et la lipogenèse, respectivement. L'augmentation de ces voies illustre la complexité métabolique du foie néonatal. Ces voies se développeront durant la première année de vie jusqu'à un métabolisme qui ressemble à celui de l'adulte (12–15).

Développement pulmonaire

Différemment du foie, le poumon n'exerce qu'une fonction : l'échange gazeux entre l'air ambiant et le sang. Puisque cet organe est plus spécialisé, son développement est plus complexe que celui

du foie, et par conséquent, la compréhension des mécanismes déclencheurs est moins avancée. Le développement pulmonaire est divisé en 5 stages : embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire (16).

Aussi, comme le foie, le développement pulmonaire commence à la 3^e semaine d'âge post-conceptionnel avec la **phase embryonnaire**. À cet âge, des cellules endodermiques de l'intestin antérieur se différencient et forment une structure tubulaire parallèle avec deux poches dans son extrémité caudale. Ces structures sont la trachée et les poumons primitifs. Ces différenciations sont synchronisées par des protéines et molécules de signalisation telles que le facteur de croissance de fibroblastes et le facteur de croissance transformant beta (TGF- β). Parallèlement, des cellules d'origine mésodermale forment la plèvre et les vaisseaux sanguins et donnent origine aux autres cellules mésenchymateuses autour de cette structure pulmonaire (17).

À partir de la 5^e semaine d'âge conceptionnel, les sacs pulmonaires entrent dans la **phase pseudoglandulaire** où les cavités pulmonaires s'expandent dans la matière mésenchymateuse. L'apparition des cellules ciliées dans ces voies marque leur spécialisation en futures bronches et bronchioles au même temps que les vaisseaux sanguins s'expandent en suivant l'expansion des voies respiratoires. Vers la 16^e semaine, jusqu'à la 26^e semaine d'âge conceptionnel, la **phase canaliculaire** du développement pulmonaire a lieu. Les événements marquants de cette phase sont la différenciation des cellules épithéliales des voies respiratoires et des alvéoles. L'expansion continue des voies aériennes permet l'infiltration des cellules épithéliales dans le mésenchyme. Les capillaires mésenchymaux stimulent la différenciation des cellules épithéliales en pneumocytes. Ce processus est similaire à celui de la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes par le contact avec la veine porte. Les pneumocytes qui se trouvent dans la couche alvéolaire deviennent les pneumocytes de type I, tandis que ceux entre les septas de deux alvéoles deviennent les pneumocytes de type II. Ces types cellulaires sont responsables des échanges gazeux et de la sécrétion du liquide surfactant, respectivement (18,19) (Figure 2). La phase canaliculaire du développement pulmonaire est la dernière phase qui donne aux poumons toutes les structures nécessaires à la respiration, même si en quantités insuffisantes. Pour cette raison, les nouveau-nés prématurés à ≥ 22 semaines d'âge gestationnel peuvent survivre, néanmoins, pas sans séquelles.

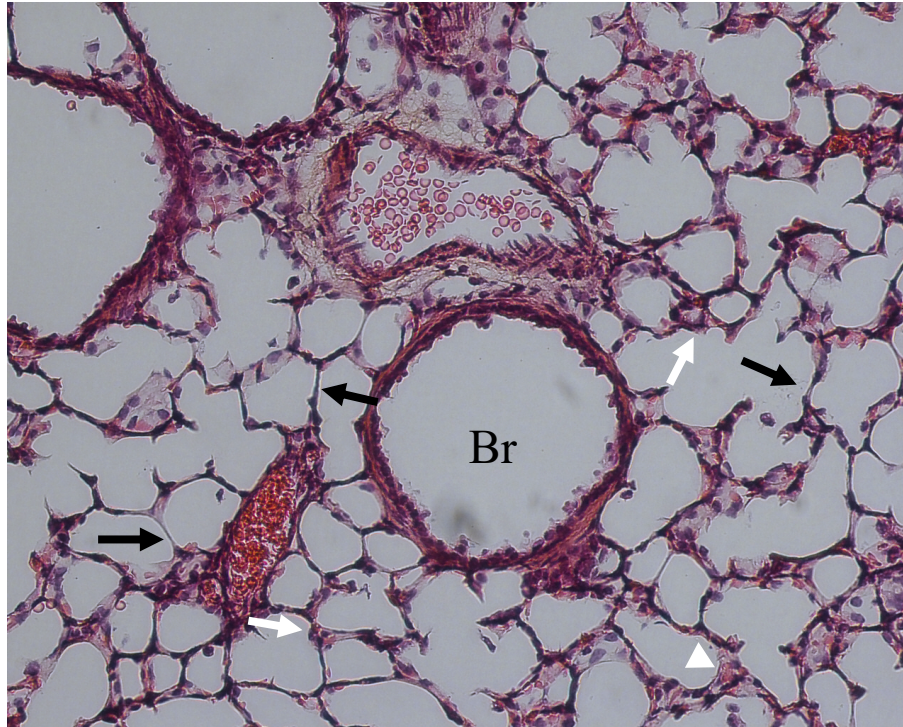


Figure 2 Marquage histologique (hématoxyline, éosine) d'un poumon d'un cochon d'Inde adulte.

Au centre, la bronchiole (Br) est observée. Les flèches noires pointent à la fine couche des alvéoles formée par les pneumocytes de type I, tandis que les flèches blanches pointent aux pneumocytes de type II. Les têtes de flèche blanche pointent aux capillaires sanguins.

Le **stage sacculaire** permet l'expansion de la surface d'échanges gazeux, formée par l'interface entre les pneumocytes de type I avec les capillaires sanguins. Durant ce stage, les saccules alvéolaires, qui précèdent les alvéoles, forment la structure d'échange gazeux. Néanmoins, différemment des alvéoles, les parois des saccules sont plus épaisses et moins capillarisées, ce qui limite les échanges gazeux. Cette phase est suivie par l'étape **alvéolisation**, qui est caractérisée par l'augmentation du nombre de capillaires de presque zéro à plus de 300 millions d'alvéoles entre la 36^e semaine d'âge conceptionnel et l'âge adulte. Durant cette étape, les saccules alvéolaires deviennent plus minces par la création des parois à l'intérieur des saccules alvéolaires. Ce processus augmente non seulement le nombre des alvéoles, mais aussi la surface d'échange gazeux et le contact avec les capillaires sanguins. Cette longue durée permet la plasticité des alvéoles

durant l'enfance, à la suite des perturbations du développement pulmonaire, telles qu'observées lors de la naissance prématurée (18,20).

Prématurité

Épidémiologie de la prématurité

La prématurité est définie comme une naissance avant 37 semaines d'âge gestationnel par l'Organisation mondiale de la Santé (21). La prématurité est ensuite divisée en 3 catégories, selon l'âge gestationnel : l'extrême prématurité (≤ 28 semaines); la grande prématurité (entre 28 et 31^{6j/7} semaines) et la prématurité moyenne (entre 32 et 36^{6j/7} semaines)(22). Dans les pays développés, tel que le Canada, le nombre d'accouchements prématurés a augmenté de 19,7% entre 1990 et 2010 (23). Globalement, un taux d'augmentation de 0.8% chaque année des taux de naissances prématurées est observé. Bien que les extrêmes et les grands prématurés représentent uniquement 1 à 2% de tous les accouchements (24), les taux des complications et de mortalité sont plus élevés dans cette population. En 2013 aux États-Unis, environ 53% des morts durant la première année de vie étaient des nouveau-nés nés avant 32 semaines de gestation, tandis que les nouveau-nés nés entre 32 et 36 semaines représentaient seulement 15% des morts (25).

Le taux de survie de ces enfants a augmenté de 70% en 1993 à 79% en 2012 (26). Cette augmentation est due aux avancements de soins en néonatalogie qui ont permis la survie des nourrissons prématurés, notamment les extrêmes prématurés. Par exemple, durant les années 1980, seulement 10% des nouveau-nés de 24 semaines d'âge gestationnel survivaient et les naissances à < 24 semaines n'étaient pas viables. Vers la moitié des années 2000, environ 65% des nouveau-nés de 24 semaines survivent, tandis que 30% et 10% des naissances à 23 et 22 semaines sont considérés comme viables. Bien que ces nouveau-nés présentent plusieurs complications à long-terme, les avancements en néonatalogie ont permis leur survie (27). Plusieurs avancements en néonatalogie ont été apportés tels que l'introduction des incubateurs pour la thermorégulation ; le développement des formules de lait avec un taux élevé de digestibilité ; le développement des tubes et cathéters d'alimentation entérale et parentérale de taille appropriée aux dimensions d'un nouveau-né prématuré; le surfactant artificiel et des raffinements du support ventilatoire (27–29).

Deux tiers des naissances prématurées sont considérés comme spontanées tandis que l'autre tiers représente des naissances induites par des raisons médicales. Bien qu'il n'y existe pas une cause unique aux naissances prématurées spontanées, plusieurs facteurs de risque ont été identifiés, tels que la prééclampsie, l'hypertension, le surpoids, ainsi que les infections ou des conditions inflammatoires, ainsi que des facteurs ethniques, socioéconomiques et culturels (30).

Les taux de prématurité varient aussi géographiquement. Les plus hauts taux de prématurité sont trouvés en Afrique subsaharienne (12,3%), et au sud de l'Asie (13,3%). Les taux les plus bas sont observés dans l'est de l'Asie (7,4%), l'Amérique latine, les Caraïbes et les pays développés (8,6%). La moyenne mondiale est de 11,1% (23). Ces statistiques indiquent que cette distribution géographique des taux de prématurité est secondaire à des facteurs socioéconomiques, génétiques et environnementaux. Une étude qui a évalué les taux d'accouchements prématurés chez une population canadienne et étatsunienne a observé un risque plus élevé d'accouchements prématurés dans la population noire non hispanique, comparativement à la population blanche. Cette différence persistait, même après le contrôle par les variables socioéconomiques. En plus, le risque était aussi élevé au Canada qu'aux États-Unis. Étant donné la différence d'accès aux services de santé dans ces deux pays, ces résultats démontrent un facteur ethnique (génétique ou culturel) associé à la prématurité (31). Une autre étude similaire comparant les taux de prématurité chez une population hispanique aux États-Unis avec ceux de la population blanche a révélé un taux plus bas chez la population hispanique immigrante. Malgré une situation socioéconomique moins favorable et moins d'accès aux services de santé, cette population avait des meilleurs taux de prématurité, ce qui réitère l'effet ethnique sur les taux de prématurité (32).

Cependant, la situation socioéconomique plus faible peut avoir un effet significatif et positif sur les taux de prématurité. Les taux de prématurité au Brésil sont un exemple de cet effet, où les accouchements césariens sont encouragés dans le système de santé privé, afin de réduire la charge médicale et augmenter les coûts réclamés aux assurances privées (33,34). Par conséquent, les prématurés représentent 32% des accouchements césariens au système public, et 51% au système privé (34). Bien que la plupart de ces naissances soient à 36 semaines, et que les complications soient moindres que les complications observées pour des naissances <32 semaines, ce phénomène augmente les statistiques de naissances prématurées.

Complications de la prématurité

Puisque le développement du nouveau-né n'est pas complet lors d'une naissance prématurée, plusieurs complications y sont associées. Elles peuvent être secondaires à une immaturité physiologique, ou aux traitements nécessaires à la survie. En plus, ces complications peuvent s'établir durant la période néonatale, ou durant l'enfance, l'adolescence ou l'âge adulte.

La figure 3 montre les périodes critiques de développement de chaque organe, selon les âges, depuis la période embryonnaire, jusqu'à l'âge de 2 ans. Ces fenêtres de développement sont les moments où les organes sont les plus sensibles aux insultes externes et où une perturbation du développement normal aura des conséquences à court et long terme. Une naissance prématurée implique une insulte, soit par l'exposition de l'organe à des facteurs environnementaux non prévus à ce stade développemental – les hautes concentrations d'oxygène aux poumons –, ou à l'exposition à des traitements nécessaires à la survie – nutrition parentérale et oxygène, par exemple. Selon les fenêtres de développement (Figure 3), une naissance prématurée à 20-36 semaines affecterait le développement pulmonaire, hépatique, musculaire, rénal, hématopoïétique, cérébral et du tissu adipeux. Les complications les plus communes découlant des naissances prématurées reflètent cette perturbation du développement. Ces complications peuvent être immédiates ou tardives.

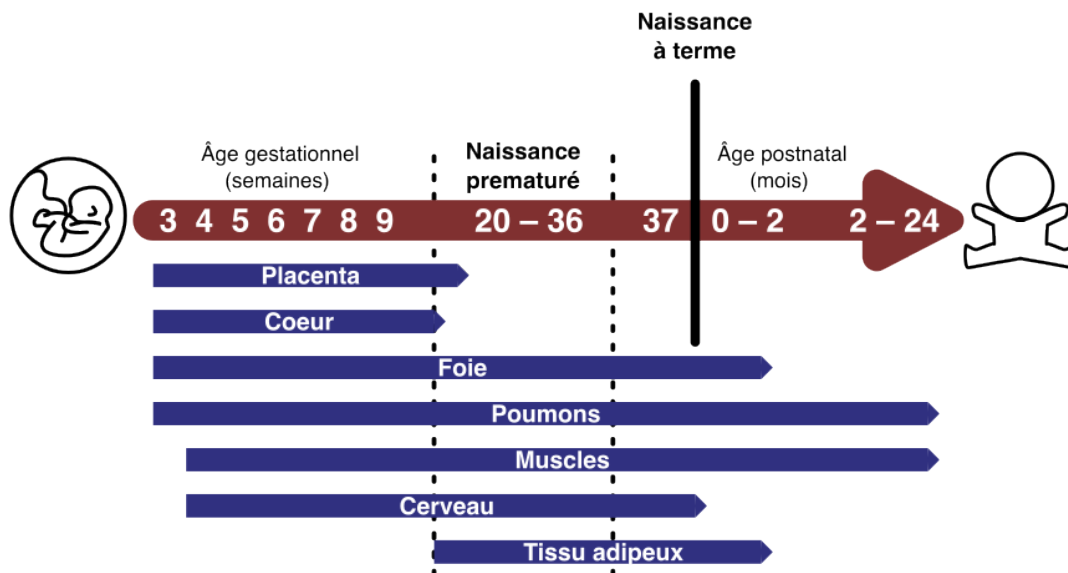


Figure 3 Fenêtres de développement de chaque organe.

Figure adaptée de McArdle et Gambling 2013 (35).

Une des complications immédiates les plus observées sur les nouveau-nés prématurés est la dysplasie bronchopulmonaire (DBP). Cette complication est caractérisée par un développement inadéquat des voies respiratoires et des alvéoles (36). La DPB est définie par le besoin d'oxygène supplémentaire à l'âge post-menstruel de 36 semaines(36,37). Puisque le développement pulmonaire est souvent perturbé lors des phases sacculaires ou d'**alvéolisation**, et que ces deux phases sont marquées notamment par l'expansion des aires d'échange gazeux, la DBP est caractérisée par une immaturité pulmonaire qui défavorise les taux d'échange gazeux adéquats aux besoins des nouveau-nés. Par conséquent, le support en oxygène est utilisé comme traitement. Néanmoins, les hautes concentrations d'oxygène contribuent au stress oxydatif pulmonaire (38,39), contre lequel les nouveau-nés prématurés n'ont pas la maturité physiologique de se défendre (40,41). Plusieurs autres facteurs sont associés au développement de la DBP, tels que l'inflammation, les infections, la ventilation mécanique au-delà des hautes concentrations d'oxygène, ainsi que la nutrition (42,43). En fait, les hautes concentrations de peroxydes contaminant la nutrition parentérale, est un des facteurs contributeurs au développement de la DBP chez les nouveau-nés nourris par cette voie (38,44–46).

La prématurité pose aussi des complications hépatiques, notamment la stéatose hépatique non-alcoolique (47) et la cholestase (48). Ces deux complications sont souvent associées au traitement avec la nutrition parentérale. Ce mode de nutrition est caractérisé par l'apport de nutriments par la veine centrale, et non par la veine porte, en exposant les hépatocytes centraux à des hautes concentrations de nutriments. Puisque ces hépatocytes ont un métabolisme plus anabolique, l'accumulation des lipides est facilitée (6). La cholestase à son tour est causée par l'inversion du flot dans les canicules biliaires et par conséquent, une impossibilité de sécrétion de bile (49).

En tant qu'effet tardif, plusieurs évidences cliniques et épidémiologiques indiquent que les nouveau-nés prématurés sont plus à risque de développer la stéatose hépatique (50), des maladies cardiovasculaires (51), l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique (52–54), ainsi que d'autres complications (55–57). Puisque les avancements en soins néonataux sont récents, les nouveau-nés prématurés nés aux années 1980 qui ont pu survivre sont présentement en âge adulte où les maladies chroniques commencent à se développer. Donc les études sont encore récentes et peu nombreuses.

Nutrition néonatale

La nutrition néonatale est celle offerte lors des 4 premières semaines après la naissance. Elle est essentielle à la transition de la période fœtale à l'enfance, à la continuation de la croissance et le développement, ainsi qu'à la programmation de la santé et des maladies durant l'enfance, adolescence et adulte. Le lait maternel est la forme de nutrition recommandée pour tous les nouveau-nés lorsqu'ils peuvent le tolérer (58). Cette forme de nutrition est associée à un taux de mortalité et de morbidités plus bas et des paramètres de développement plus avancés durant les deux premières années de vie chez les enfants allaités pendant 6 mois, comparativement à ceux allaités pendant 3 à 4 mois ou nourris par une formule de lait (59,60).

Non seulement le lait maternel contient tous les nutriments et facteurs bioactifs nécessaires à la survie, croissance et développement de l'enfant, mais cette composition évolue avec le temps et l'enfant. Bien que les formules de lait aient une composition nutritionnelle plus similaire à celle du lait maternel, les enjeux financiers et de salubrité empêchent une composition identique. Les formules de lait manquent de facteurs bioactifs, tels que les cellules (macrophages, cellules souches et lymphocytes), les cytokines, les facteurs de croissance, les anticorps, les hormones, les micro-ARNs, et les composés phytochimiques provenant de l'alimentation de la mère (61–65).

Bien que le lait maternel soit le meilleur choix, les nouveau-nés de moins de 32 semaines d'âge gestationnel ne peuvent pas coordonner les mouvements de succion et déglutition (66). L'administration du lait maternel ou des formules de lait par voie entérale est capable d'apporter des nutriments essentiels sans des effets secondaires majeurs. Néanmoins, les extrêmes prématurés ne possèdent pas encore la mobilité gastro-intestinale nécessaire pour la digestion adéquate des nutriments (67). Ces enfants doivent être nourris par une nutrition parentérale, qui peut apporter des effets secondaires indésirables majeurs.

Nutrition parentérale néonatale

La nutrition parentérale néonatale (NP) est le mode de nutrition choisi pour la plupart des extrêmes prématurés. Cette voie nutritionnelle est capable d'offrir de l'eau, des acides aminés, des lipides, des vitamines et des minéraux au nouveau-né, et ce, par la voie intraveineuse. Avant le

développement des solutions de NP, les nouveau-nés ne pouvaient qu'être nourris par voie entérale, ou par l'allaitement maternel. Étant donné que les nourrissons prématurés ne peuvent pas digérer le lait, des complications gastro-intestinales avaient lieu. Ce n'est que dans les années 1970 que la NP a pu être administrée aux nouveau-nés qui en avaient besoin (68,69).

Bien que la NP apporte les nutriments nécessaires, il est préférable de diminuer au maximum le temps auquel le nouveau-né est sous NP, et ce, à cause de ses effets indésirables. Les complications hépatobiliaires sont les plus communes, telles que la stéatose, hépatite, fibrose, et la cholestase liée à la nutrition parentérale (48,70). Cette dernière est causée principalement par l'apport de nutriments à partir de la veine et l'artère hépatique, au lieu de la veine porte. Ce changement de direction du flot sanguin dans le foie mène à une stase de la bile dans les canaux biliaires (48,71).

L'autre complication de la nutrition parentérale est la charge oxydante apportée. Cette charge oxydante est composée de deux facteurs : 1) la présence de peroxydes; 2) et la diminution des concentrations des composants antioxydants. Dans les solutions de NP, les nutriments sont dilués dans un sac exposé à la lumière ambiante pendant plusieurs heures. Ces sacs sont perméables et ils permettent l'entrée et la dilution de l'oxygène de l'air ambiant dans le sac. Cette combinaison de facteurs permet la réaction d'oxydation de plusieurs nutriments, et ce, par le don des électrons des composants réduits, tels que les acides aminés, les lipides et les vitamines (72–75). L'oxygène divalent (O_2) est réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui reste dans la solution et qui est infusé aux nouveau-nés. Bien que cette réaction soit spontanée, la lumière qui atteint les sacs de NP photoexcite la riboflavine en solution, qui à son tour, catalyse le transfert d'électrons. Cette réaction dans la solution où les vitamines sont diluées à une concentration de 3% contribue à la génération d'environ $1500\mu M$ de peroxydes après 3h, tandis que les solutions de lipides génèrent environ $300\mu M$ de peroxydes après 20h de photoexposition (72,73).

Puisque la riboflavine dans la NP provient des solutions concentrées de vitamines, l'ascorbate (vitamine C) devient une cible importante de cette réaction, car il est présent en hautes concentrations dans ces solutions et il possède des électrons facilement arrachables. Une étude *in vitro* a démontré qu'environ 15% de l'ascorbate en solution photoprotégée sans riboflavine est dégradé après 3h. Une dégradation de 50% de l'ascorbate est observée si cette même solution est incubée avec riboflavine sous la lumière. Après 24h, il ne restait aucune vitamine C en solution. Cette dégradation était accompagnée d'une augmentation d'environ 60% d'acide thréonique, un

produit de dégradation de l'ascorbate. La réaction de l'acide déshydroascorbique avec le H₂O₂ génère aussi un peroxyde, l'ascorbylperoxyde (76).

L'ascorbylperoxyde fait partie des peroxydes contaminant la NP. Bien que le H₂O₂ représente environ 90% des peroxydes de la NP (73), l'ascorbylperoxyde semble avoir un effet très endommageant à des faibles concentrations. Les peroxydes sont capables de causer un stress oxydatif pulmonaire, d'induire l'inflammation, d'induire la mort cellulaire programmée (apoptose) et de diminuer le nombre d'alvéoles chez les cochons d'Inde nourris par voie parentérale pendant 4 jours (45). Chez les nouveau-nés prématurés, l'ascorbylperoxyde urinaire durant la première semaine de vie était associé avec le développement de la dysplasie broncho-pulmonaire (46). Au foie, l'ascorbylperoxyde cause un stress oxydatif, une augmentation de la captation du glucose et une diminution de la synthèse des acides gras (77). Bref, les peroxydes, notamment l'ascorbylperoxyde, ont un effet néfaste sur le développement pulmonaire et la transition métabolique au foie.

Puisque la formation des peroxydes est fortement stimulée par la photoexcitation de la riboflavine, la photoprotection complète des solutions de nutrition parentérale est maintenant recommandée (78,79). La photoprotection des solutions permet l'augmentation des concentrations de vitamine C au foie des cochons d'Inde nourris par NP (80,81). Chez les nouveau-nés prématurés, cette photoprotection est associée à 50% moins de mortalité dans la période néonatale (44) et à la prévention des hypertriglycémies (82).

Les recommandations des concentrations de micronutriments dans les solutions de NP néonatale ne sont pas complètement mises à jour. La vitamine C est un bon exemple : historiquement, sa concentration dans les solutions de NP était basée sur les concentrations optimales chez les enfants et les adultes (83), soit 80 mg/kg/j. Ensuite, une étude de 1986 a évalué qu'une dose parentérale de 52mg/kg/j résulte à une concentration plasmatique d'ascorbate 3 fois plus élevée que celle des enfants à terme (84). Par la suite, il était convenu que des concentrations plus basses devraient être administrées et qu'en absence d'études concluantes, une formulation à 25mg/kg/j serait utilisée. Aucune étude n'a été faite avec cette dose, et ce, depuis 1986 (83). En 2018, la Société Européenne pour la Nutrition parentérale et Entérale (*European Society for Parenteral and Enteral Nutrition* – ESPEN) a recommandé que les concentrations en vitamine C dans la nutrition parentérale néonatale soient maintenues, vu le manque de nouvelles études, à 15-25mg/kg/j (85). Bref, les

recommandations en vitamine C aux nouveau-nés prématurés ont été établies en fonction des cibles de vitamine C plasmatique des nouveau-nés à terme, ainsi que le manque d'effet délétère de cette dose chez les nouveau-nés prématurés. La vitamine C illustre un effet qui semble être vrai aussi pour la vitamine A et plusieurs vitamines hydrosolubles (85).

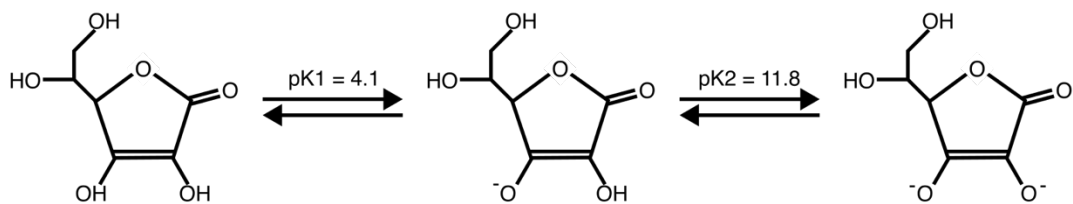
Vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique (AA) (*a-* du grec = « absence » + *-scorbique* = « scorbut ») est une des premières vitamines découvertes. Depuis 1753, le médecin James Lind connaissait les effets antiscorbutiques du jus d'orange et de citron, mais selon lui, le climat de la mer était responsable de cette déficience (86,87). Ce n'est qu'en 1932 que Sylvester Solomon Zilva a démontré l'effet du jus de citron sur la guérison du scorbut chez les cochons d'Inde et a attribué ces effets à une vitamine (88). Puisque des travaux étaient postérieurs à ceux de la découverte des vitamines A et celles du complexe B, donc la nomenclature « vitamine C » était la suite logique (89). Néanmoins, l'acide ascorbique n'est pas essentiel à toutes les espèces, car la plupart peuvent en synthétiser à partir du glucose. Pour ce faire, l'enzyme hépatique L-gulonolactone oxydase est nécessaire. Les humains, quelques primates et les cochons d'Inde ont perdu le gène de cette enzyme par l'évolution convergente, voilà 20-60 millions d'années (90).

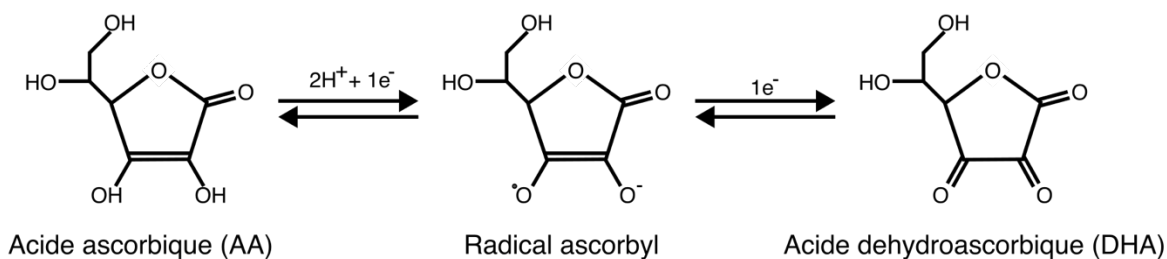
Bien que la guérison du scorbut ait été identifiée depuis 1932, les taux de déficience en vitamine C restent encore élevés. Une étude canadienne a démontré que 14% de la population de Toronto avait une déficience en vitamine C, caractérisé par les niveaux plasmatiques $<11\mu\text{M}$, et 33% avait un niveau sous optimal (niveaux plasmatiques entre 11 et $28\mu\text{M}$) (91). Un résultat similaire était trouvé aussi dans une population étatsunienne (92). Les hommes, les fumeurs, les consommateurs de drogues et les personnes en surpoids sont des populations à risque plus élevées, dues à la charge oxydative plus élevée et les habitudes alimentaires différentes (91–94). Ces données reflètent les habitudes alimentaires pauvres en fruits et légumes – sources de vitamine C – dans ces populations. Par exemple, entre 70 et 80% de la population canadienne ne consomme pas les 5 portions recommandées de fruits et légumes par jour (95,96). Ces habitudes de vie se reproduisent aussi dans d'autres pays. La consommation de fruits et légumes – et conséquemment de vitamine C – est encore plus basse dans les pays de l'Asie et de l'Afrique (97,98).

La demi-vie de l'AA dans le plasma est d'environ 1 jour et cela est expliqué par la grande accumulation de l'AA dans les compartiments intracellulaires et l'absence d'entreposage. Il s'accumule notamment dans le foie et les poumons ($\cong 1$ mM) en support de la défense antioxydante, dans le cerveau et les glandes surrénales ($\cong 2-10$ mM) afin de soutenir la biosynthèse de norépinéphrine et tyrosine (99). L'AA est absorbé dans les intestins par le transporteur dépendant du Na^+ , SVCT1, aussi présent au foie, poumons et glandes surrénales, tandis que l'acide déshydroascorbique (DHAA – de l'anglais, *dehydroascorbic acid*) est absorbé par les transporteurs de glucose de la famille GLUT.

Les propriétés de l'acide ascorbique proviennent de sa capacité à donner des électrons. À un pH de 7.4, la vitamine C est à 99.95% dans sa forme semi-quinone, avec une charge négative dans l'oxygène-3 de sa structure (Figure 4). À la suite du don de deux électrons, la vitamine C s'oxyde et devient DHAA. Le couple AA/DHAA possède une des plus hautes capacités antioxydantes parmi les couples biologiques. Cette capacité est exprimée par un potentiel redox de -174 mV. Le potentiel redox est une mesure de la capacité des espèces antioxydantes de donner un électron, indiqué par la négativité de la valeur en millivolts (100,101). Ce potentiel redox, permettrait la réduction de plusieurs molécules oxydantes et/ou oxydées, telles que le radical hydroxyle (OH^\bullet), les radicaux des acides gras polyinsaturés, et le radical α -tocophéryle, provenant de l'oxydation de la vitamine E (100).



États d'ionisation de l'acide ascorbique



États d'oxydation de l'acide ascorbique

Figure 4 États d'ionisation et oxydation de l'acide ascorbique.

Ces propriétés antioxydantes de l'AA lui donnent ses fonctions. Chez les humains, l'AA est impliqué dans la synthèse du collagène, de la carnitine, de la tyrosine, de la norépinephrine, le contrôle de la transcription génique, et ce comme cofacteur des enzymes di- et monooxygénases (tableau 1). L'AA est aussi impliqué dans les réactions d'oxydoréduction des résidus de cystéine oxydés sur les protéines et de la vitamine E. Les fonctions de l'AA expliquent les symptômes de sa déficience. Par exemple, un des symptômes précoces du scorbut est la fatigue, secondaire à la diminution de la synthèse de norépinephrine et carnitine, impliquées dans la stimulation nerveuse et l'oxydation des acides gras, respectivement. Les troubles de cicatrisation, les hémorragies et la perte de dents dans les états les plus avancés de la maladie sont causés par un défaut de la synthèse de collagène, nécessaire à l'intégrité des tissus (99).

Tableau 1 Enzymes qui utilisent la vitamine C comme cofacteur et ses fonctions

Enzyme	Fonction
Prolyl-3-hydroxylase	Synthèse de collagène
Prolyl-4-hydroxylase	
6- <i>N</i> -Triméthyl- <i>l</i> -lysine hydroxylase	Synthèse de carnitine
Tyrosine-4-hydroxyphenylpyruvate hydrolase	Synthèse de tyrosine
Dopamine- β -monooxygénase	Synthèse de norépinephrine
TET (ten-eleven translocation) enzyme	Déméthylation de l'ADN
<i>Jumonji-C domain-containing histone demethylase</i>	Déméthylation des histones
Hypoxia inducible factor-prolyl hydroxylases	Dégradation du facteur induit par hypoxie

Référence : Tableau adapté de Levine, 1986 (102).

Deux importantes fonctions de l'AA en tant que cofacteur enzymatique sont ses fonctions de régulation de la transcription génique, soit par la modulation épigénétique, soit par l'inactivation de HIF-1 α . Au niveau épigénétique, l'AA participe dans la réaction d'hydroxylation de la 5-méthylcytosine (5mC), en la convertissant en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), catalysée par l'enzyme *ten-eleven translocation* (TET) (103). Cette conversion précède sa transformation en cytosine non méthylée. La 5mC empêche l'expression du gène où elle est placée, donc en convertissant la 5mC en 5hmC, l'AA permet l'expression des gènes dont la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est un mécanisme de modulation (103). Cette déméthylation dépendante de la vitamine C semble importante à la pluripotence des cellules embryonnaires et elle est essentielle au développement (103–105). L'autre fonction épigénétique de l'AA est exercée par sa participation dans la réaction de l'enzyme *Jumonji-C domain-containing histone déméthylase*, que catalyse la déméthylation de la lysine K36 aux histones H3 (106). Cette réaction, permettant aussi l'expression génique, joue aussi un rôle sur la reprogrammation cellulaire durant

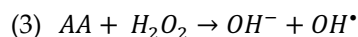
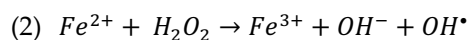
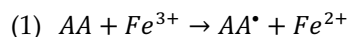
la période embryonnaire (107). Enfin, l'AA participe aussi dans la réaction d'hydroxylation de HIF-1 α par l'action de l'enzyme *hypoxia inducible factor-prolyl hydroxylase*, qui précède la polyubiquitinylation et dégradation du HIF-1 α . Ainsi, l'AA a un effet inhibiteur sur HIF-1 α (108,109), un facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'hypoxie et essentiel pour la transition métabolique lors de la naissance.

Au-delà de ses fonctions en tant que cofacteur enzymatique, l'AA possède aussi des fonctions antioxydantes directes. L'AA est un antioxydant direct de quelques radicaux libres, tels que le superoxyde (O₂^{•-}) (k= 1 x 10⁵ M⁻¹•s⁻¹)(110), le radical hydroxyle (HO[•])(k=1 x 10¹⁰ M⁻¹•s⁻¹), les peroxydes lipidiques (k= 1 x 10⁹ M⁻¹•s⁻¹), et le α -tocophéryle (k= 1 x 10⁷ M⁻¹•s⁻¹) (99). L'AA peut aussi réduire des oxydants importants telles que le peroxyde d'hydrogène, l'espèce réactive d'oxygène la plus abondante dans les cellules. Cependant, la vitesse de cette réaction est très lente (k= 2 M⁻¹•s⁻¹) et peut être négligeable *in vivo* (111). L'AA donc participe de la réduction de ces EROs qui peuvent endommager des macromolécules telles que les lipides membranaires, les protéines et l'ADN.

L'AA peut réduire les résidus de cystéine oxydés (P-SOH) par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en thiolate (P-S⁻). Cette réaction peut se substituer par celle de la glutarédoxine, mais avec une constante de réaction beaucoup plus basse pour l'AA (k_{P-SOH → P-S}= 1 x 10³ M⁻¹•s⁻¹) (99). Cette voie devient importante quand les concentrations en AA sont élevées (112). Alternativement, quand le résidu de cystéine oxydé réagit avec le peroxyde d'azote (ONOO⁻), la nitrosylation de ce résidu a lieu (P-SNO), une modification qui peut être aussi réduite par l'AA (113,114).

Enfin, l'AA peut exercer des fonctions oxydantes, vu sa haute capacité de don d'électron, et ce, par la réaction de Fenton avec le fer et le H₂O₂. L'AA peut réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺), qui a une haute réactivité avec l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène. La réaction avec ces molécules permet la génération des radicaux superoxyde et hydroxyle, respectivement.

La réaction avec le peroxyde d'hydrogène est décrite ci-dessous.



Ces radicaux sont très réactifs et peuvent endommager les molécules biologiques tels que les lipides. Ce mécanisme oxydatif peut mener à un processus de mort cellulaire programmée dépendante du fer, nommé ferroptose (115). Ces propriétés oxydantes de l'AA sont observées en hautes concentrations de AA et/ou de fer (116,117). Ces hautes concentrations sont connues pour mener un dommage oxydatif à l'ADN (116,118,119).

La vitamine C en période néonatale

Durant la grossesse, le fœtus est capable de concentrer la vitamine C dans ses cellules. À la naissance, les niveaux de vitamine C plasmatiques des nouveau-nés sont 25% à 70% plus élevés que les niveaux plasmatiques des mères. Cela est une démonstration de l'importance de la vitamine dans la période fœtale (120,121). Cette accumulation est plus importante lors du début du 3^e trimestre de gestation. Grâce à cet effet, les nouveau-nés prématurés de 24 à 28 semaines d'âge post menstruel ont des niveaux plasmatiques deux fois plus élevés que ceux des nouveau-nés à terme. Ces hautes concentrations sont nécessaires au fonctionnement des prolyl et lysyl hydroxylases lors de la synthèse du collagène, soutenant ainsi la croissance et le développement des tissus (122).

Le changement de la voie d'apport en vitamine C entre la grossesse et la période néonatale, combiné avec les niveaux accrus de stress oxydatif après la naissance, mène à une diminution d'environ 65%/jour des niveaux de vitamine C plasmatiques (122). Cette diminution est compensée par une augmentation des concentrations en vitamine C dans le lait maternel à partir de la 2^e semaine de vie pour l'enfant à terme, et à partir de la 1^{ere} pour l'enfant prématuré (123).

Cystéine

La cystéine est l'un des 20 acides aminés essentiels à la synthèse protéique. Sa forme oxydée, la cystine, était découverte pour la première fois en 1811 dans des calculs rénaux trouvés dans la vessie d'un enfant. La cystine était alors nommée avec le nom grec de « vessie », soit *kystis* et c'était le premier acide aminé découvert (124).

Chez les humains, la cystéine peut être synthétisée au foie, par la voie de la transsulfuration. La voie de transméthylation, ou le cycle de la méthionine précède cette voie (Figure 5). Dans ce cycle, la méthionine est convertie en homocystéine par l'action des enzymes, notamment la méthionine-adénosyltransférase (MAT) qui limite cette voie. Cette première partie du cycle fournit le S-adénosyl-méthionine, le substrat pour les réactions de méthylation, telles que la méthylation de l'ADN (125). Entre 30 à 50% de l'homocystéine est ensuite recyclée en méthionine par les enzymes méthionine synthase ou bêtaïne-homocystéine-méthyltransférase. Les 50 à 70% restants d'homocystéine servent comme substrat pour la voie de transsulfuration, où l'homocystéine est irréversiblement convertie en cystathionine et ensuite en cystéine, α -cétobutyrate et l'ammonium. Le but de cette voie est de transférer l'atome de soufre de l'homocystéine à la serine, tandis que la structure carbonique de l'homocystéine est rejetée sous la forme d' α -cétobutyrate (126).

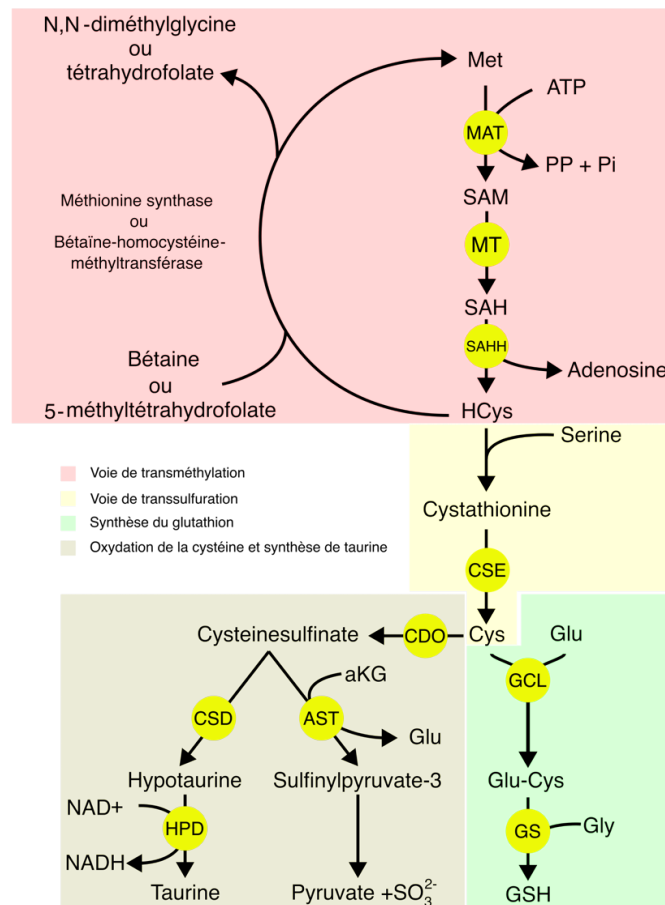


Figure 5 Voies de transméthylation, transsulfuration, oxydation de la cystéine et synthèse du glutathion.

Les enzymes sont représentées par des cercles jaunes : MAT : méthionine adénosyltransférase; MT : méthyltransférases; SAHH : S-adénosyl-homocystéine hydrolase; CSE : cystathionase; CDO : cystéine dioxygénase; CSD : cystéine sulfinatase; HPD : hypotaurine déshydrogénase; AST : aspartate aminotransférase; GCL : glutamate-cystéine ligase; GS : glutathion synthétase.

Acides aminés : Met : méthionine; HCys : homocystéine; Cys : cystéine; Glu : glutamate; Gly : glycine.

Aussi comme pour la vitamine C, les fonctions de la cystéine découlent de sa capacité de donner des électrons et de s'oxyder. Cette capacité est exercée par le groupement thiol ($-SH$) de sa chaîne latérale. La grosse taille de l'atome et sa faible négativité permettent une liaison chimique relativement faible avec l'hydrogène. La serine, qui possède la même structure que la cystéine, mais détient un atome d'oxygène à la place de l'atome de soufre, ne possède pas la capacité de donner des électrons, car l'oxygène est plus électronégatif que le soufre. Cette logique s'applique aux autres atomes qui peuvent remplacer le soufre dans la cystéine, tels que le sélénium dans la sélénocystéine, et le tellurium dans la tellurocystéine. Ces deux derniers acides aminés ont une capacité de don d'électrons encore plus élevée que la cystéine. Le thiolate ($-S^-$) est la version ionisée du thiol et la forme nécessaire pour la plupart des réactions qui impliquent la cystéine. Le pKa du groupe thiol est de 8,3, une valeur proche du pH physiologique de 7,4, mais encore plus élevée, permettant la préservation du groupe thiol dans les conditions physiologiques et des réactions redox qui requièrent peu d'énergie. Un microenvironnement basique peut transformer le thiol en thiolate et augmenter la réactivité de ce groupement (127).

La cystéine est destinée à la synthèse de protéines, de glutathion, de taurine ou de pyruvate, dans cet ordre de priorité. La synthèse de protéines est la destination principale de la cystéine, vu la haute affinité de l'acide ribonucléique (ARN) transporteur de la cystéine ($K_m=20\mu M$ (128)). La glutamate-cystéine ligase (GCL), la première enzyme de la synthèse du glutathion a un K_m pour la cystéine 50% plus élevé ($K_m=30\mu M$ (129)), et il est encore plus élevé pour la synthèse de taurine et pyruvate ($K_m=45\mu M$ (130)). Puisque la synthèse protéique est prioritaire, en cas d'insuffisance en cystéine ou méthionine, les niveaux de protéines sont moins affectés, tandis que la synthèse de taurine et pyruvate seront nulles. La taurine et le pyruvate peuvent être obtenus par l'alimentation

ou par d'autres voies métaboliques. Donc, en cas d'insuffisance de cystéine, la synthèse de glutathion est la voie plus compromise.

Bien que la synthèse de cystéine par les voies de transméthylation et transsulfuration soit possible, la voie de transsulfuration n'est pas active chez les nouveau-nés (131). Par conséquent, la cystéine est un acide aminé conditionnellement essentiel, car sa consommation par l'alimentation est essentielle uniquement durant la période néonatale. L'immatunité de la voie de transsulfuration est secondaire aux faibles activités de l'enzyme cystathionase, la deuxième enzyme de la voie. Par conséquent, les concentrations de cystéine sont plus basses, menant à déficience de la synthèse de glutathion, dépendante des concentrations de cystéine (41,132). Parallèlement, une immatunité de la captation de cystéine est aussi observée chez les nouveau-nés. Plusieurs essais cliniques ont testé l'augmentation de la concentration de cystéine dans l'alimentation des nouveau-nés, mais aucun effet sur les niveaux de glutathion n'a été observé (41,133–136). Donc, d'autres thérapies visant l'augmentation des niveaux de glutathion chez les nouveau-nés prématurés doivent être explorées.

Origines développementales de la santé et des maladies (ODSM - DOHaD)

Le concept de ODSM découle de la théorie de Barker des Origines Fœtales des Maladies Adultes (137). En 1986, Barker et coll. ont démontré, dans une étude écologique, une corrélation positive entre les taux de mortalité infantile au passé et la mortalité par la maladie ischémique du cœur en âge adulte (138). Plus récemment, des études dans la cohorte de la famine néerlandaise ont démontré que les adultes exposés in utero à la famine de 1944-5 présentaient une intolérance au glucose, une microalbuminuria, un profil lipidique athérogénique, plus de risque de maladies coronariennes, et d'obésité (femmes). Les complications métaboliques étaient plus sévères pour ceux qui avaient subi la famine au 1^{er} trimestre de gestation, comparativement à ceux qui l'avaient subi au 3^e trimestre (139,140). Ces études ont élucidé un effet temporel des expositions sur la sévérité des complications, ce qui a permis l'évolution du concept de Barker.

Le concept des origines fœtales des maladies adultes propose que les insultes environnementales affectent le fœtus d'une façon permanente, car il est dans une phase rapide de croissance, de développement et d'organogénèse. Étant donné que jusqu'à l'âge de 2 ans, les enfants sont aussi

en phase de croissance et développement rapide, le concept s'est élargi au concept des Origines développementales de la Santé et des Maladies (ODSM) (141,142).

L'ODSM propose que la santé et le développement des maladies à l'âge adulte sont programmés par des événements environnementaux durant la période de développement entre la conception et l'adolescence, telle que la nutrition inadéquate, la pollution de l'air, la prise de médicaments, la prématurité et possiblement même les conditions climatiques (143–145). Ces événements en début de vie agissent comme un senseur environnemental du fœtus et du nouveau-né pour qu'il puisse s'adapter à l'environnement où il vivra. Évolutivement, les organismes ont développé une plasticité développementale afin de mieux s'adapter et survivre aux conditions environnementales. La plasticité développementale décrit la capacité des organismes de vérifier les conditions environnementales dans lequel ils se développent. Par exemple, la fourrure des campagnols des champs, un rongeur nord-américain, est plus épaisse chez les rongeurs nés durant l'automne que celle des animaux nés en printemps (146). Ce mécanisme adaptatif est aussi observé chez les humains, mais d'une façon plus nuancée. Les adultes ayant subi une déficience énergétique durant leur période fœtale ont un métabolisme énergétique plus anabolique, et ce dernier fonctionne en préparation à une autre période de déficience alimentaire (142). Ces exemples démontrent les adaptations tardives à l'environnement afin d'augmenter la survie dans cet environnement spécifique. Bien que ces ajustements étaient développés pendant l'évolution pour que les individus puissent faire face à une diversité d'environnements, actuellement, avec la globalisation, l'urbanisation et la standardisation des pratiques de santé, les environnements deviennent de plus en plus homogènes et stables. Ces adaptations en début de vie peuvent devenir moins favorables et même délétères à la santé de l'individu. Quand l'environnement adulte ne correspond pas à celui des premiers moments de vie, une incompatibilité développementale a lieu (Figure 6). Par exemple, dans les pays développés, où l'offre alimentaire est élevée, il serait très improbable qu'un individu se retrouve dans une situation de déficience énergétique en âge adulte. L'incompatibilité développementale est caractérisée par un décalage des limites homéostatiques, et elle est illustrée dans la figure 6.

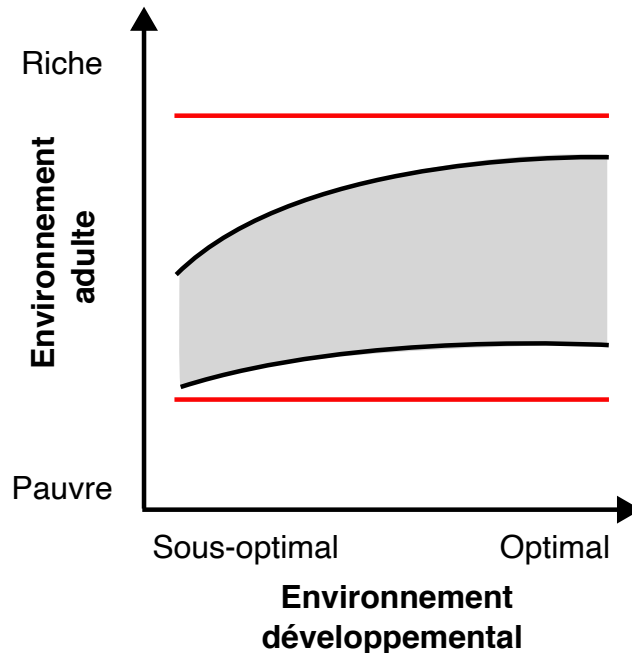


Figure 6 Représentation graphique du concept d'incompatibilité développementale.

Les lignes rouges représentent les limites supérieures et inférieures possibles et compatibles à la survie pour un stimulus (e.g. : la nutrition), tandis que les lignes noires représentent les limites homéostatiques pour lesquelles un individu sera en santé. Un individu qui se développe dans un milieu optimal (à droite dans l'axe des abscisses) aura des limites homéostatiques plus larges et moins de décalage entre les limites homéostatiques et les limites possibles. Un individu qui se développe dans un environnement sous-optimal (à gauche dans l'axe des abscisses) aura une étendue des limites homéostatiques plus étroite et décalée vers les limites inférieures. Si l'apport énergétique est pris comme exemple, l'individu à la droite pourra avoir un apport plus élevé, proche des limites possibles et être en santé. En contrepartie, l'individu à la gauche sera en santé avec des apports énergétiques plus bas, mais il aura plus de tendances à développer des complications si son apport est proche des apports possibles supérieurs, car il est plus loin de sa limite homéostatique supérieure. Figure adaptée de (147).

Les principaux facteurs de risque étudiés sont les insultes d'ordre nutritionnel, notamment la déficience en énergie, en protéine ou en fer, et la diète riche en lipides. Les diètes pauvres en protéines (148) ou fer (149) durant la grossesse induisent des effets similaires, soit une

augmentation de la pression artérielle systolique de l'ordre de 10-20% chez la progéniture des rats. Bien qu'aucun changement de poids ne soit observé chez les animaux sur la diète hypoprotéique, un retard de croissance pondérale de 15% chez les mâles et 25% chez les femelles dont les mères avaient reçu une diète déficiente en fer était observé. D'ailleurs, les souris dont les mères étaient nourries avec une diète riche en lipides présentent une augmentation du poids corporel, de la pression systolique, de la rigidité artérielle et une diminution de synthèse d'oxyde nitrique endothélial ce qui représente un phénotype d'hypertension artérielle (150,151). Le point en commun entre toutes ces études est le développement tardif d'un phénotype d'hypertension.

Plusieurs mécanismes ont été proposés comme étant des médiateurs de la programmation développementale tels que : une perturbation du développement structural de l'organe (152,153); une perturbation de l'homéostasie endocrine (35); la longueur des télomères (154); et les mécanismes épigénétiques (155,156). Ces mécanismes sont proposés à cause de leur influence sur la santé à long terme, mais il n'est pas encore connu comment ils sont déclenchés par les insultes nutritionnelles. Un facteur en commun qui peut les déclencher est un stress oxydatif, par une modulation du cycle cellulaire (101), une réorganisation structurale des organes (149,157,158), le dommage oxydatif de l'ADN (30) et une modulation des enzymes impliquées dans le métabolisme épigénétique (103,159–163). Le stress oxydatif est un excellent candidat en tant que mécanisme précurseur des mécanismes programmeurs.

Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre de l'homéostasie redox vers le côté oxydatif qui mène à un déséquilibre de la signalisation redox et des dommages moléculaires (164). Ce concept implique un système antioxydant et un système oxydant. Le stress oxydatif est induit alors par une augmentation de la charge oxydante, une diminution des défenses antioxydantes, ou une combinaison des deux (165). La définition de stress oxydatif est encore stratifiée selon le niveau d'intensité et le résultat de ce stress. Cette catégorisation est décrite dans le tableau 2.

Tableau 2 Classification des niveaux de stress oxydatif selon l'intensité, voies de signalisation activées, résultats et conséquences physiologiques.

Intensité du stress oxydatif	Voie de signalisation activée	Résultat	Conséquence physiologique
Basse	Nrf2/Keap1	Augmentation des enzymes antioxydantes	Réponse adaptative
Moyenne	NF-κB, AP1, MAP kinases, HSP	Augmentation des enzymes antioxydantes, protéines inflammatoires et protéines de choc thermique	Réponse adaptative et dommage cellulaire
Haute	-	Ouverture des pores de perméabilité mitochondriaux	Nécrose, apoptose

Tableau adapté de (166)

AP1 : Protéine activatrice 1 ; HSP : Protéine de choc thermique; Keap1 : « *kelch-like ECH-associated protein 1* » ; MAP : « *Mitogen-activated protein kinases* » ; NK-κB: facteur nucléaire kappa B; Nrf2: « *nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2* ».

Ce stress oxydatif peut être engendré par différentes voies, tel que : 1) Voie exogène : déficience alimentaire d'un nutriment essentiel à la défense antioxydante (acide ascorbique, caroténoïdes, tocophérol, polyphénols, sélénium, fer, zinc, cuivre ou manganèse); par l'infusion directe de peroxydes dans le cas de la nutrition parentérale (77,167,168); ou même par un surplus de substrats énergétiques qui, par la saturation de la chaîne respiratoire, induit une formation accrue des EROs (169); ou par le métabolisme des médicaments et des polluants ou de façon endogène, créé en réponse à l'inflammation secondaire à des facteurs exogènes (170) ; 2) Voie physiologique : au niveau des organes et des compartiments intracellulaires, des régions seront sous un stress oxydatif physiologique. Par exemple, le potentiel redox est plus positif dans le réticulum endoplasmique pour permettre un environnement oxydatif et la formation des ponts disulfure entre les résidus de cystéine des protéines (171). Bien que cette catégorie ne soit pas compatible avec la définition de stress oxydatif, car elle ne représente pas un déséquilibre homéostatique, elle est incluse comme

une catégorie de stress oxydatif pour des raisons historiques (164); 3) Stress photooxydatif et médié par radiation : les rayonnements ultraviolets et la radiation stimulent des molécules photosensibles qui ensuite génèrent des EROs, ou causent un dommage direct aux molécules biologiques (165).

La molécule de signalisation commune de la plupart des mécanismes générateurs de stress oxydatif est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)(172). De façon endogène, le H_2O_2 provient principalement de la dismutation du radical libre superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) généré principalement dans la mitochondrie, mais aussi par les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases (NOX), les xanthine oxydases (XO), et le cytochrome p450 (171,173). Cette dismutation est catalysée par les enzymes superoxyde dismutases (SOD). Différemment du $O_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 est une molécule neutre et relativement stable. Elle peut diffuser au travers les membranes mitochondriales et activer des voies de signalisation (174), telles que l'oxydation des résidus de cystéines des protéines, en affectant leurs fonctions (159,175), ou la stimulation d'une réponse antioxydante par l'oxydation de la protéine « *kelch-like ECH- associated protein 1* » (Keap1), qui ensuite se dissocie du facteur de transcription « *nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2* » (Nrf2)(176). Le Nrf2 stimule l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante (GCLC, GCLM (synthèse de glutathion) et GPX2 (glutathion peroxydase 2)), dans le métabolisme de l'hème (ferrochelatase et hème oxydase 1), dans la synthèse de NADPH (glucose 6-phosphate déshydrogénase), entre autres (177). Bien que la voie du H_2O_2 /Nrf2 soit la plus commune, d'autres voies de signalisation sont aussi activées par le H_2O_2 telles que celle du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), de la protéine activatrice 1 et p53, entre autres (178). Cette signalisation est importante pour les voies métaboliques où le stress oxydatif est impliqué, tel que la régulation du métabolisme énergétique, de la réponse hypoxique et la réponse à l'exercice physique (179,180). Néanmoins, l'homéostasie redox peut être déséquilibrée si le H_2O_2 atteint des concentrations très élevées, car il peut réagir avec des ions divalents par la [réaction de Fenton](#) et générer le radical hydroxyle. Le radical hydroxyle est moins stable et réagit facilement avec l'ADN, les lipides et les protéines, et les endommage (171).

Les altérations causées par la signalisation du H_2O_2 , lorsque contrôlées, favorisent la synthèse de glutathion et son recyclage. L'expression plus élevée de glutathion peroxydase (GPx) par la voie du Nrf2/Keap1 permet la réduction du H_2O_2 . La GPx est une sélénoprotéine qui utilise deux

molécules de glutathion réduit (GSH) pour inactiver une molécule de H_2O_2 , en générant deux molécules d'eau et une molécule de glutathion disulfure (GSSG) (178). Une diminution des niveaux de GSH est attendue après une génération exacerbée de H_2O_2 (162).

Glutathion

Le GSH, ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine, est le thiol le plus abondant aux cellules. Il est synthétisé à partir du glutamate, de la cystéine et de la glycine dans deux réactions dépendantes de l'adenosine triphosphate (ATP) et catalysées par la glutamate-cystéine ligase (GCL) et la glutathion synthase (GS) (181). Grâce à sa capacité antioxydante élevée ($E^\circ_{\text{GSH/GSSG}} = -240 \text{ mV}$) et son accumulation cellulaire (101), le GSH sert comme cofacteur de réactions enzymatiques de réduction, telles que celles catalysées par la GPx et la glutathion transférase (GST) et la glutaredoxine (GRX). Notamment, la GPx catalyse la réaction d'inactivation de peroxydes tel que le H_2O_2 et l'ascorbylperoxyde (171). Cette réaction génère du GSSG qui peut être recyclé par l'action de l'enzyme glutathion réductase (GR) qui utilise deux molécules de NADPH provenant de la voie des pentoses phosphate pour réduire le GSSG en GSH. Aussi comme le H_2O_2 , le GSH et le GSSG sont reconnus comme étant des molécules de signalisation cellulaire (175). Les niveaux élevés de GSSG ou de H_2O_2 sont associés avec une activité de glutathionylation (182). Quelques protéines, par la présence des résidus de cystéine oxydables dans les domaines régulateurs de la protéine, ont leur fonctionnalité affectée par l'oxydation de ces résidus de cystéine (P-SO_{1/2/3}H; P-SSG; P-SNO; P-SS-P). Par exemple, l'activité d'enzymes du métabolisme énergétique (183–189) et de la régulation épigénétique (159,162,190) peut être modulée par les niveaux de GSH, de GSSG et de H_2O_2 .

Signalisation redox

Le H_2O_2 est la molécule de signalisation redox la plus répandue, et ce par son rôle central et intégrateur dans le métabolisme redox, ses propriétés de diffusion au travers les membranes et par sa haute capacité oxydante ($E^\circ_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}} = +1349 \text{ mV}$) (191). Le H_2O_2 réagit principalement avec les résidus de cystéine dans les protéines. Néanmoins, pour que cette réaction ait lieu, l'atome de soufre doit être sous sa forme thiolate (P-S⁻) et non sous la forme thiol (P-SH). La forme thiol est

la forme plus commune, puisque le pKa de ce groupement est de 8,3, plus élevé que le pH physiologique de 7,4. Les résidus de cystéine en proximité des résidus d'acides aminés basiques (histidine, arginine, asparagine et lysine) peuvent être sous la forme thiolate, vu le microenvironnement basique autour de ces acides aminés (192).

Le thiolate de ces résidus de cystéine réagit facilement avec le H_2O_2 et génère un résidu de cystéine acide sulfénique (P-SOH), une altération allostérique qui engendre des changements conformationnels. L'oxydation de la cystéine en acide sulfénique donne une instabilité au résidu de cystéine. Afin d'éviter l'oxydation supplémentaire et irréversible de ce résidu, il réagit rapidement avec d'autres molécules pour générer un résidu plus stable. Par exemple, l'acide sulfénique peut se transformer par la formation des ponts disulfures internes ou avec un autre résidu d'une autre unité protéique (P-SS-P), la glutathionylation (P-SSG), la nitrosylation (P-SNO). Parmi ces conversions, la glutathionylation est favorisée, vu la mise en place des mécanismes réducteurs spécifiques.

Les enzymes thiorédoxine (TRX) et GRX sont capables de renverser la glutathionylation et les ponts disulfure internes. Ces enzymes font partie de la même famille de protéines et elles possèdent un site actif avec le motif CXXC. Un des résidus de cystéine de ce motif est sous la forme thiolate. Le résidu glutathionylé de la protéine cible forme un pont disulfure avec le thiolate de la TRX/GRX, permettant des modifications conformationnelles qui favorisent la réaction du deuxième résidu de cystéine avec ce pont disulfure. Cette deuxième réaction mène à la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéinyles du site actif et la réduction complète du pont disulfure de la protéine ciblée (191). La TRX oxydée sera réduite par la thiorédoxine réductase avec l'utilisation du NADPH, tandis que la GRX sera réduite par deux molécules de GSH, qui est ensuite oxydé en GSSG. Ce GSSG est réduit par l'action de la GR avec le NADPH comme cofacteur. Donc, la grande différence entre les deux enzymes est la dépendance ou non du glutathion. Bien que les deux enzymes aient des mécanismes similaires, les concentrations micromolaires de NADPH limitent la réaction de la TRX, tandis que les concentrations millimolaires de GSH favorisent celle de la GRX.

Les changements oxydatifs des résidus de cystéine entraînent souvent une diminution de la fonction protéique, mais pour quelques protéines telles que l'actine (193) et la protéine kinase activée par AMP (AMPK), l'oxydation des cystéinyles les activent (194). Ce mécanisme joue un

rôle essentiel sur la signalisation de la réponse antioxydante lors d'un stress oxydatif, et ce par l'activation de la voie de signalisation Nrf2/Keap1. Lors d'une insulte oxydative, les concentrations de H₂O₂ augmentent. Dans des conditions non oxydatives, Keap1 reste lié à Nrf2, empêchant sa translocation vers le noyau. Lorsque les concentrations de H₂O₂ augmentent, il oxyde les résidus de cystéine sur Keap1, qui se dissocie de Nrf2. Le Nrf2 peut être transloqué vers le noyau afin d'activer l'expression des gènes soutenant les défenses antioxydantes. Ces adaptations peuvent rétablir l'homéostasie redox.

Relation entre le glutathion et la vitamine C

Le glutathion et l'acide ascorbique sont deux facteurs antioxydants avec des potentiels redox parmi les plus négatifs des molécules biologiques (-240 et -174 mV, respectivement). Le DHA peut être réduit en AA par le GSH, tandis que le GSSG peut être réduit en GSH par la GR avec le NADPH comme cofacteur. Le NADPH provient de la voie de pentoses phosphate, qui utilise le glucose ($E^{\circ}_{\text{Glucose}/\text{CO}_2} = -430 \text{ mV}$). Ces relations sont illustrées dans la figure 7.

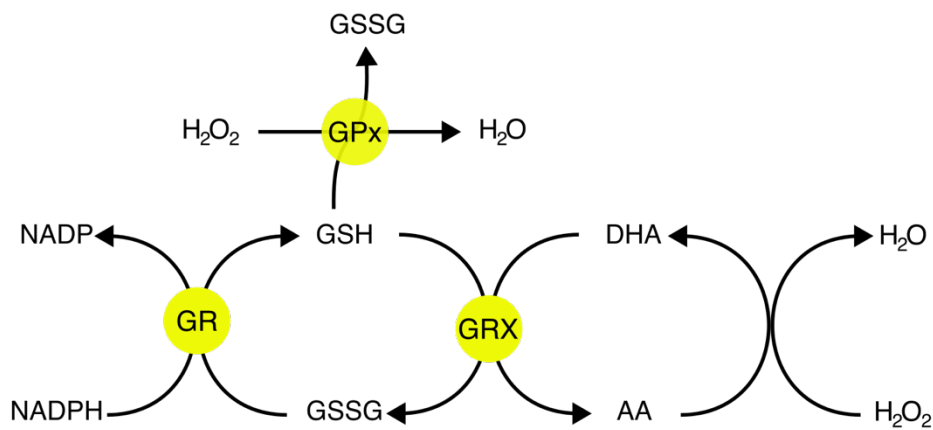


Figure 7 Relation entre l'acide ascorbique, le glutathion et le NADPH.

Les enzymes sont représentées par des cercles jaunes : GPx :Glutathion Peroxydase; GR : Glutathion Réductase; GRX : Glutarédoxine.

Chez les cochons d'Inde déficients en vitamine C, la supplémentation en glutathion retarde le début des symptômes de scorbut, mais elle ne peut pas le prévenir (195). Ce fait illustre le remplacement de l'acide ascorbique par le glutathion dans quelques réactions et le recyclage du DHA en AA par

le glutathion, ainsi que l'AA reste essentiel à quelques réactions. La supplémentation en acide ascorbique est aussi capable d'augmenter les niveaux de GSH et elle empêche la mort causée par la déficience en glutathion. Même si l'AA n'est pas capable de recycler le GSSG en GSH, les niveaux augmentés de AA peuvent diminuer l'utilisation du GSH lors du recyclage de DHA (196). Ainsi, ces deux antioxydants sont interdépendants et échangeables pour certaines fonctions, mais ils possèdent des fonctions spécifiques à eux-mêmes.

La relation entre ces deux antioxydants est établie par deux liens :

1) la détoxification des EROs : Le GSH sert comme cofacteur de la GPx, une enzyme qui détoxifie les peroxydes tels que le H_2O_2 . Le GSH participe aussi de la réduction de la glutarédoxine, qui s'oxyde afin de rétablir les résidus de cystéine oxydés par le H_2O_2 . L'AA peut, par des réactions non enzymatiques, réduire le H_2O_2 , ainsi que les résidus de cystéine oxydés en acide sulfénique, et ce, même à une vitesse plus basse. Puisque cette fonction est partagée par les deux antioxydants, une compensation peut avoir lieu lorsqu'un des deux est en manque;

2) le recyclage du DHA : plusieurs mécanismes peuvent réduire le DHA en AA, mais le mécanisme prédominant est la réaction de la glutarédoxine (197,198). La GRX s'oxyde afin de réduire une molécule de DHA en AA. Ensuite elle utilise deux molécules de GSH afin de réduire sa propre oxydation. Cette réaction génère du GSSG, qui ensuite est réduit par la GR (Figure 7)(198). Différemment de la détoxification des EROs, ce lien entre le glutathion et l'AA est unidirectionnel. Donc, un manque de GSH diminue les niveaux de AA, mais l'inverse est faux. Néanmoins, il est possible qu'un surplus d'AA augmente les niveaux de GSH puisqu'aucun recyclage de DHA ne serait nécessaire (196).

Métabolisme énergétique hépatique

Le foie est le centre d'intégration du métabolisme des glucides, lipides et protéines. Cette place centrale est remarquable par quelques fonctions: 1) Premier passage des nutriments absorbés par les intestins; 2) Métabolisme d'alanine et lactate provenant d'autres organes, notamment les muscles, pour la transformation en glucose par la gluconéogenèse; 3) Régulation des niveaux de glucose sanguins par le contrôle du stockage du glycogène et la gluconéogenèse; 4) Régulation

des niveaux des lipoprotéines de transport de lipides, ainsi que des acides gras libres au plasma (199).

Étant donné la prévalence des maladies métaboliques caractérisées par la favorisation de l'anabolisme, les voies anaboliques hépatiques sont de grand intérêt, notamment, la glycolyse, la voie de pentoses-phosphate (VPP), et la lipogenèse. Bien que la glycolyse soit une voie catabolique, elle a un caractère anabolique au foie car elle génère des précurseurs d'autres voies anaboliques tels que le glucose 6-phosphate pour la VPP, et le pyruvate pour la lipogenèse par une transformation en acétyl-CoA. Le glucose fonctionne comme métabolite de départ pour les autres voies. L'énergie de ses liaisons chimiques peut être utilisée pour la génération d'ATP (glycolyse; cycle de l'acide tricarboxylique; phosphorylation oxydative); pour le stockage de lipides (glycolyse; lipogenèse); la synthèse des acides aminés non essentiels; stockage de glycogène (glycolyse; glycogénèse); et synthèse de ribose 5-phosphate et NADPH (VPP) (199). Étant donné ce rôle central, la glycolyse est fortement contrôlée dans trois réactions : la première réaction, catalysée par l'hexokinase (Glucose \rightarrow Glucose 6-Phosphate), la troisième, catalysée par la phosphofructokinase-1 (PFK-1) (Fructose 6-phosphate \rightarrow Fructose 1,6-biphosphate) et la dernière, catalysée par le pyruvate kinase (Phosphoenolpyruvate \rightarrow Pyruvate) (70). L'importance de ces voies métaboliques a déjà été démontrée. La modulation de l'activité de ces enzymes est associée au développement de maladies métaboliques, telles que la stéatose hépatique (200–202), le cancer (203), ou le diabète (204,205). Puisque l'hexokinase contrôle la rétention du glucose intracellulaire et la PFK-1 et pyruvate kinase contrôlent la glycolyse en soit, et que la PFK-1 est plus fortement contrôlée que la pyruvate kinase (206,207), la pyruvate kinase n'était pas étudié.

Glucokinase

Au foie et dans les cellules β -pancréatiques, l'hexokinase existe dans son isoforme IV, aussi appelée glucokinase (GCK). Les deux grandes différences entre la glucokinase et les autres isoformes d'hexokinase est que 1) La glucokinase a un K_m très élevé pour le glucose (10 mM vs. 0.2 mM des autres hexokinases); et 2) La glucokinase n'est pas inhibée par son produit, le glucose 6-phosphate. Ces deux caractéristiques de la glucokinase permettent une augmentation de la captation du glucose plasmatique à la suite d'une hyperglycémie, et la génération de glucose 6-phosphate en excès qui sera utilisé comme substrat pour la glycogénèse, lipogenèse et VPP.

Au foie, le transporteur de glucose prédominant est le GLUT2, qui permet une diffusion passive du glucose selon la glycémie, sans aucun contrôle de l'absorption. Puisque le glucose 6-phosphate ne peut pas être diffusé par le GLUT2, la phosphorylation du glucose par la GCK fonctionne comme mécanisme de rétention du glucose dans le cytosol (208). Donc, la présence de la glucokinase au foie permet à cet organe de contrôler la glycémie par la rétention du glucose au cytosol. Sans la glucokinase, le glucose aurait pu se diffuser au plasma par le GLUT2 suite à une baisse glycémique (199).

Phosphofructokinase-1

Le deuxième point de contrôle, celui de la phosphofructokinase-1 (PFK-1) est stratégique pour le bon fonctionnement de la glycolyse. Après la génération du glucose 6-phosphate par la glucokinase, ce produit peut être utilisé par les enzymes des trois grandes voies métaboliques : 1) Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), l'enzyme de l'étape limitante de la VPP; 2) Phosphoglucomutase, la première enzyme de la glycogénèse; ou 3) Phosphoglucose isomérase, qui transforme le glucose 6-phosphate en fructose 6-phosphate qui ensuite est utilisé dans la réaction de la PFK-1 (209). L'emplacement du point de contrôle métabolique de la PFK-1 après ce branchement de trois grandes voies métaboliques permet un contrôle spécifique de la glycolyse, différemment de celui de la glucokinase qui contrôle uniquement la captation de glucose au foie (199,210).

Cycle de Krebs et phosphorylation oxydative

Le pyruvate provenant de la glycolyse entre dans la mitochondrie et est transformé en acétyl-CoA par l'enzyme pyruvate déshydrogénase. Afin de générer de l'énergie dans le Cycle de Krebs, l'acétyl-CoA doit se lier à l'oxaloacétate par l'action de l'enzyme citrate synthase. Cependant, les concentrations d'oxaloacétate dans la matrice mitochondriale sont en dessous du K_m de l'enzyme, ce qui limite sa réaction. Alors, l'acétyl-CoA stimule une autre enzyme, la pyruvate carboxylase, qui génère de l'oxaloacétate à partir du pyruvate provenant de la glycolyse. Une grande concentration de pyruvate est nécessaire afin de générer à la fois l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate. Ces concentrations sont atteintes dans la période postprandiale. Ce mécanisme de régulation

empêche que le cycle de Krebs continue à consommer des substrats énergétiques en conditions de jeûne. La présence de l'oxaloacétate initie le cycle de l'acide tricarboxylique. Ce cycle est composé de 9 réactions séquentielles où le citrate (6 carbones) perd des électrons, transférés au NAD^+ , ainsi que deux carbones, sous la forme de CO_2 . Ce cycle produit 3 molécules de NADH , une molécule de FADH_2 et une molécule d'ATP ou GTP. Le but de cette voie métabolique est de transférer l'énergie de l'acétyl-CoA aux transporteurs d'électrons. Cette étape conclut aussi l'oxydation du glucose, car tous ses carbones ont été transformés en CO_2 . Néanmoins, le potentiel énergétique du glucose n'est pas encore transformé complètement en énergie utilisable (ATP) (211).

Ce n'est qu'à la phosphorylation oxydative que l'énergie du glucose est transférée à l'ATP. Cette voie est composée par 4 complexes mitochondriaux qui couplent le transfert d'électrons des transporteurs d'électrons (NADH et FADH_2) au transport de protons de la matrice mitochondriale à l'espace intramembranaire. Tandis que le complexe I accepte les électrons du NADH , le complexe II accepte ceux du FADH_2 . Puisque le complexe I accepte les électrons du NADH de la matrice mitochondriale, un domaine de la protéine doit baigner dans la matrice. Ce milieu riche en O_2 favorise le transfert d'électrons partiel du NADH au complexe I et la réduction partielle de l'oxygène en O_2^\cdot , une ERO très puissante. Les complexes I et II transfèrent les électrons à la coenzyme Q, qui ensuite est oxydée au complexe III. Ce complexe est aussi responsable de la génération de O_2^\cdot (212) lors de l'oxydation du coenzyme Q. Enfin, les électrons sont transférés au complexe IV par le cytochrome *c*. Ce dernier complexe est responsable du dernier transfert d'électrons à O_2 , avec la génération d'eau dans la matrice mitochondriale. Lors du passage d'électrons à travers chaque complexe, des protons sont transférés à l'espace intermembranaire. Ces transferts créent un potentiel électrochimique entre les deux compartiments qui alimente la production d'ATP par l'enzyme ATP synthase. Cette enzyme couple le transfert de protons de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale à la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP. Ces deux voies métaboliques sont essentielles pour la génération d'énergie (ATP), la signalisation redox (O_2^\cdot) et le contrôle de substrats cellulaires. Par exemple, l'acétyl-CoA généré avant le cycle de Krebs est utilisé dans la réaction d'acétylation de protéines, tandis que l' α -cétoglutarate du cycle de Krebs est un substrat des réactions d'hydroxylation.

Lipogenèse

La lipogenèse est une voie qui fonctionne uniquement dans les situations d'abondance de nutriments, notamment les glucides et protéines. Les deux grands activateurs de la lipogenèse sont les concentrations élevées en citrate et en ATP (213–215). Le citrate indique un surplus de pyruvate provenant du glucose et le surplus en ATP est un indicateur que les besoins énergétiques de la cellule ont été atteints (210,216). Les concentrations augmentées de citrate et d'ATP activent l'enzyme citrate lyase, qui exporte le citrate de la mitochondrie vers le cytosol et le clive en acétyl-CoA et oxaloacétate. L'oxaloacétate peut être transformé en pyruvate et retourner à la mitochondrie, tandis que l'acétyl-CoA devient disponible pour la lipogenèse, ainsi que des réactions d'acétylation de protéines.

La voie lipogénique est composée par deux enzymes, l'acétyl-CoA-carboxylase (ACC) et l'acide gras synthase (AGS). L'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction produit du malonyl-CoA et est l'étape limitante de la voie métabolique; ensuite, l'AGS catalyse la liaison entre le malonyl-CoA (3C) et l'acétyle (2C). Cette réaction utilise deux molécules de NADPH en tant que réducteur et génère du CO₂ et le butyryl-CoA (4C). L'AGS répète la réaction en utilisant le butyryl-CoA à la place de l'acétyl-CoA, permettant l'élongation de la chaîne lipidique de 2 carbones par cycle. L'AGS passe par 7 cycles d'élongation afin de générer le palmitoyl-CoA (16C), le produit le plus commun de cette voie. La réaction de l'AGS démontre le coût énergétique élevé de cette voie métabolique ($8 \text{ Acétyl-CoA} + 8 \text{ HCO}_3 + 16 \text{ NADPH} \rightarrow 1 \text{ palmitoyl-CoA} + 8 \text{ CO}_2 + 16 \text{ NADP}$). La lipogenèse est dépendante de l'abondance énergétique ainsi que du cofacteur redox NADPH (217).

Contrôle des voies métaboliques au foie

Les voies métaboliques au foie sont contrôlées principalement par les facteurs nutritionnels tels que l'afflux en glucose, et acides aminés, ainsi que les concentrations d'insuline. La glucokinase est normalement conjuguée à la protéine régulatrice de la glucokinase (GKR). Cette protéine se lie au site de liaison du glucose sur la glucokinase et promeut la translocation de ce complexe protéique au noyau, où la glucokinase ne peut pas phosphoryler le glucose. Lorsque les concentrations de glucose augmentent >5mM dans l'hépatocyte, la glucokinase se dissocie de la GKR et revient au cytosol où elle peut catalyser la phosphorylation du glucose (218). Le fructose

6-phosphate, le produit de la 2^e réaction de la glycolyse est normalement phosphorylé par la phosphofruktokinase-1 en fructose 1,6-biphosphate. Néanmoins, il peut être phosphorylé au carbone 2 afin de générer le fructose 2,6-biphosphate, un régulateur allostérique de la glycolyse. L'enzyme qui catalyse cette réaction, la phosphofruktokinase-2, est capable de se lier à la glucokinase et augmenter son activité (219), tandis que le fructose 2,6-biphosphate est un régulateur allostérique positif de la phosphofruktokinase-1. Ces trois mécanismes sont déployés rapidement, dès que les concentrations de glucose augmentent (220,221).

Le glucose agit de façon indirecte sur le contrôle transcriptionnel de ces voies métaboliques. Par la stimulation de la sécrétion d'insuline au pancréas, ces deux facteurs coordonnent une réponse glycolytique et lipogénique au foie. Le glucose stimule le facteur de transcription *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP) et l'insuline induit le facteur de transcription *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c* (SREBP-1c). Le ChREBP stimule l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse (GKR, PFK-1 et pyruvate kinase) et lipogénèse (ACC et AGS), tandis que le SREBP-1c stimule ceux de la lipogénèse (ACC et AGS)(222). L'action de ces deux facteurs de transcription est essentielle à l'expression des gènes lipogéniques (223,224). Le ChREBP est activé par la déphosphorylation catalysée par la protéine phosphatase 2A (PP2A). La PP2A est largement activée par le xylulose 5-phosphate et le glucose 6-phosphate, deux métabolites provenant du métabolisme du glucose par la VPP. En revanche, le ChREBP est désactivé par la phosphorylation catalysée par l'AMPK et la protéine kinase A, les deux induites par le glucagon (225,226). Bien que les mécanismes sous-jacents à l'activation du SREBP-1c ne soient pas définis, il est possible que la voie du mTORC1, activée par l'insuline, soit le mécanisme prépondérant (227,228).

Dernièrement, la phosphorylation des enzymes du métabolisme énergétique est un mécanisme largement utilisé pour le contrôle de ces voies. Elle est contrôlée par les signaux hormonaux de l'insuline et du glucagon. Dans les conditions de jeûne, le glucagon augmente les niveaux d'AMP, qui activent l'AMPK. Cette dernière phosphoryle l'ACC et la PFK-1, en réduisant leurs activités, et par conséquent, la glycolyse et la lipogénèse (229). L'AMPK inhibe aussi le ChREBP et le SREBP-1c, permettant la réduction de la transcription des gènes des enzymes de ces voies métaboliques (230). Parallèlement, la liaison du glucagon à son récepteur membranaire permet l'élévation des niveaux d'AMP cyclique, qui active la protéine kinase A. À son tour, cette dernière, phosphoryle et inactive la pyruvate kinase et inhibe la fonction kinase de la PFK-2. Cette action

entraîne la diminution des niveaux de fructose 2,6, biphosphate, le principal activateur allostérique de la PFK-1 (231). Au contraire, dans la période postprandiale, les niveaux élevés d'insuline stimulent son récepteur sur la membrane de l'hépatocyte, qui a son tour déclenche la voie de phosphorylation de l'Akt, qui finit par l'activation du SREBP-1c (232).

Épigénétique

Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN fait partie des mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression génique sans altération du code génomique. Elle est caractérisée par l'ajout d'un groupement méthyle dans la position 5 des cytosines faisant partie d'un dinucléotide CpG (83). Les CpGs sont souvent trouvés groupés dans les îlots CpGs dans les régions promotrices des gènes, ce qui suggère leur implication dans la régulation de l'expression génique. Une région promotrice riche en cytosines méthylées (5mC) empêche la transcription d'un gène (233). Bien que la méthylation dans le promoteur du gène soit associée avec l'extinction génique, la méthylation dans le corps du gène était associée avec l'activation de la transcription (234).

Les niveaux de méthylation sont contrôlés par deux groupes d'enzymes : ADN-méthyltransférases (DNMT 1, 3a et 3b) et Ten-Eleven translocation (TET 1, 2 et 3). Les DNMTs sont responsables de la méthylation de l'ADN en utilisant le donneur de méthyle S-adénosyl-méthionine, tandis que les TET catalysent la déméthylation des 5mC dans 3 étapes d'oxydation qui utilisent le Fe^{+2} , le 2-oxoglutarate, l'oxygène moléculaire et l'acide ascorbique (103,190,235,236). Les niveaux de méthylation de l'ADN varient selon plusieurs facteurs, notamment le stade de vie (237–239), le stress oxydatif (162,237) et le métabolisme énergétique (190,240).

Épigénétique et complications à long terme

Une étude évaluant la méthylation de l'ADN de plus de 2800 paires de jumeaux mono- et dizygotiques a démontré une relation positive entre le temps de cohabitation des jumeaux avec les niveaux de méthylation de l'ADN en âge adulte. Une cohabitation plus longue – donc une exposition environnementale similaire – était associée à un état de méthylation de l'ADN similaire entre les jumeaux à l'âge adulte. Cette relation était plus forte chez les monozygotiques que chez

les jumeaux dizygotiques. Cette étude démontre que l'état de la méthylation de l'ADN est composé des facteurs génétiques, et environnementaux, et que les sites de méthylation dépendants des facteurs génétiques sont plus facilement affectés par des facteurs environnementaux. Les facteurs environnementaux associés à une modification de la méthylation étaient le tabagisme, l'âge gestationnel à la naissance, la consommation d'alcool, l'adiposité, l'indice de masse corporelle (IMC) et la fonction pulmonaire. Ces facteurs affectent les gènes associés avec l'adiposité, les désordres métaboliques, les maladies cardiovasculaires et les cancers (241).

La méthylation observée chez les humains est causée jusqu'à 40% par des facteurs génétiques, tandis que les facteurs environnementaux survenus durant l'enfance peuvent contribuer entre 8 à 40%, avec une moyenne d'environ 20% (242). Néanmoins, l'ensemble de ces facteurs peut être modulé, soit par des interventions sur la santé des mères et pères (facteurs génétiques héréditaires), soit par les interventions périnatales et/ou pédiatriques.

Plusieurs études ont associé le risque de développer des maladies avec la méthylation globale de l'ADN, la méthylation de quelques gènes ou encore de quelques dinucléotides CpG. Par exemple, la méthylation était associée avec l'adiposité (243), la santé cardiovasculaire et le risque cardiovasculaire (244), l'obésité, la diète riche en gras (245), l'IMC (246) et les maladies pulmonaires (247). Cependant, la plupart des études ne font qu'associer la méthylation à un risque plus élevé, sans une démonstration de lien de causalité. En revanche, quelques études ont montré que l'administration d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN peut renverser des comportements de latence en âge adulte suite à la maltraitance en enfance (248). Bien que les études sur le renversement des perturbations causées par les insultes durant le développement ne soient pas nombreuses, elles démontrent l'importance de la méthylation de l'ADN comme mécanisme connecteur entre les insultes durant le développement et les complications en âge adulte. Des études sur les effets de la méthylation de l'ADN sur les complications métaboliques ne sont pas encore faites. Puisque la correction pharmacologique de la méthylation de l'ADN n'est pas encore possible chez les humains, la prévention des perturbations épigénétiques est essentielle pour la santé à long-terme.

Épigénétique, métabolisme énergétique et métabolisme redox

La méthylation de l'ADN est dépendante de la disponibilité du donneur de méthyle S-adénosyl-méthionine, généré à partir de la méthionine et l'ATP par la réaction de la MAT. Puisque la MAT peut être inactivée par l'oxydation des cystéines (249–251), les niveaux élevés en H_2O_2 pourraient diminuer les concentrations de S-adénosyl-méthionine, et par conséquent la méthylation de l'ADN. Des études démontrent aussi qu'un défaut de la génération d'ATP mitochondrial diminue les niveaux de méthylation de l'ADN (252). La DNMT possède un domaine CXXC, nécessaire à son activité (159), et puisque cette enzyme est inactivée par l'excès de H_2O_2 (253), il est suggéré que cette enzyme soit régulée par des modifications oxydatives des résidus de cystéine.

Le 2-oxoglutarate est un cofacteur de l'activité de TET et il est généré surtout dans le cycle de Krebs à partir de l'isocitrate. Le 2-oxoglutarate peut continuer dans le cycle de Krebs pour la réduction de NAD^+ , mais il peut être aussi exporté au noyau pour la réaction de la TET. La décarboxylation du 2-oxoglutarate libère l'énergie nécessaire pour la réaction d'oxydation de cytosines et la diminution des concentrations de 2-oxoglutarate peut limiter l'activité de TET. Malgré le manque d'évidences solides sur les effets de limitation de l'activité de TET par le 2-oxoglutarate, son ajout au milieu de culture cellulaire est capable de stimuler la déméthylation médiée par TET ainsi que l'expression de gènes associés à la pluripotence dans les cellules embryonnaires (254). Puisque la TET utilise aussi l'acide ascorbique pour maintenir la réduction du fer dans son site catalytique, il est possible que les concentrations cellulaires en acide ascorbique puissent réguler l'activité de TET. Cette modulation est démontrée *in vitro*, mais pas *in vivo*, car l'acide ascorbique n'est pas essentiel au fonctionnement de la TET lorsque les concentrations de fer sont suffisantes (103,160).

Un autre point de connexion du métabolisme énergétique avec la méthylation de l'ADN est par l'acétylation des histones. Les histones sont les protéines impliquées dans l'enroulement de la chromatine. L'acétylation de ces histones permet la décompactation de la chromatine et la transcription génique. Il est proposé que la méthylation de l'ADN soit dépendante de l'acétylation des histones (255). Alors, dans un état nourri, les concentrations de glucose sont suffisamment élevées pour favoriser la génération d'acétyl-CoA, le substrat des histone acétyl-transférases. Les augmentations des niveaux d'acétyl-CoA induisent une acétylation des histones, ce qui permet la déméthylation de l'ADN (240,252,256). Une des classes d'enzymes qui catalysent la

désacétylation des histones, les sirtuines utilisent le NAD^+ comme capteur d'acétyl. À la suite d'un manque de substrats énergétiques, le NAD^+ s'accumule. Son augmentation stimule l'activité des sirtuines, en même temps que le niveau diminué d'acétyl-CoA limite l'activité des histone acétyl-transférase. Cette balance favorise la désacétylation des histones (257) et par conséquent la méthylation de l'ADN (258).

Une représentation de ces voies métaboliques, ainsi que celles déjà discutées est illustrée dans la figure 8.

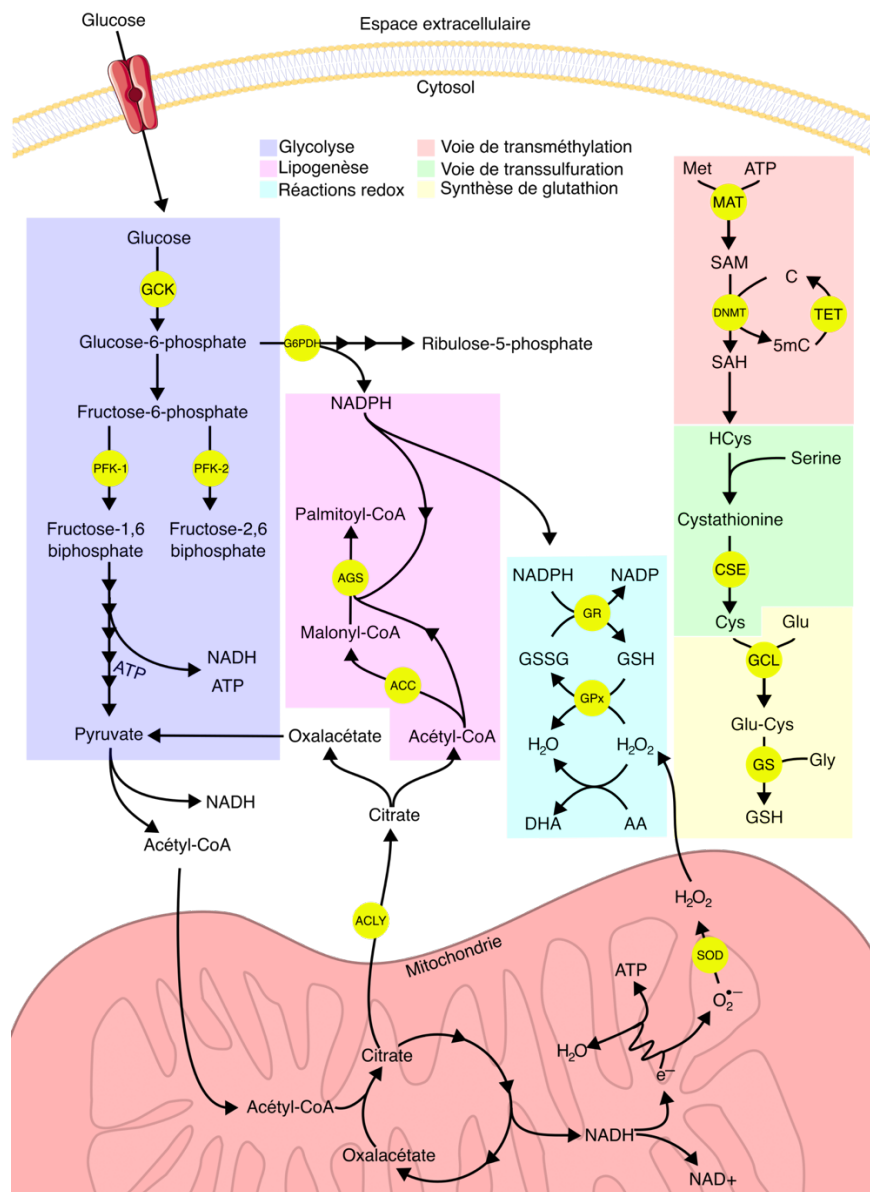


Figure 8 Intégration des voies métaboliques étudiées.

Les enzymes sont représentées par des cercles jaunes : GCK : glucokinase; G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase; PFK-1 : phosphofructokinase-1; PFK-2 : phosphofructokinase-2; ACLY : ATP-citrate lyase; ACC : acétyl-CoA-carboxylase; AGS : acide gras synthase; SOD : Superoxyde dismutase; GPx : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; MAT : méthionine adénosyltransférase; DNMT : DNA méthyltransférase TET : Ten-eleven translocation enzyme; CSE : cystathionase; GCL : glutamate-cystéine ligase GS : glutathion synthase.

Problématique

Durant la période fœtale, le métabolisme global du fœtus fonctionne en hypoxie, ce qui limite la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie, et par conséquent la production d'ATP (259). Ces conditions sont nécessaires pour le développement intra-utérin (260,261). Lors de la naissance, l'augmentation des concentrations d'oxygène permet une transition métabolique et l'adaptation au nouvel environnement. Cette transition est associée à une hausse de la respiration mitochondriale et à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène, qui génèrent une charge oxydative considérée comme le facteur déclencheur des changements métaboliques vers le métabolisme néonatal et adulte (259,262). Une charge oxydative supplémentaire en période néonatale pourrait perturber cette transition métabolique et causer des complications.

De plus, un stress oxydatif supplémentaire chez les nouveau-nés peut provenir de plusieurs sources, telles que : une supplémentation en oxygène, l'administration de médicaments, une déficience alimentaire en nutriments soutenant la défense antioxydante, ou l'administration de nutrition parentérale (NP). La NP apporte un double fardeau oxydatif au nouveau-né : une carence en vitamine C (instable en solution), ainsi qu'une exposition à des peroxydes oxydants autogénérés par l'interaction des composants de la NP (76). Bien que ces facteurs ne soient pas applicables à tous les nouveau-nés, ils sont souvent concomitants, particulièrement chez les prématurés.

Le glutathion est la molécule antioxydante endogène la plus abondante dans les cellules, et celle avec l'un des potentiels redox le plus négatifs parmi les molécules biologiques (100). Le stress oxydatif supplémentaire en début de vie diminue les niveaux de glutathion dans le foie, le poumon, le muscle et le cerveau chez le cochon d'Inde et dans le sang du nouveau-né prématuré (38,263–266). Ses niveaux sont naturellement bas chez les nouveau-nés, comme conséquence de l'immaturité de la voie de transsulfuration qui génère la cystéine (précurseur du glutathion) à partir de la méthionine (8, 11). Les niveaux de glutathion régulent de façon directe ou indirecte le métabolisme de glucose, lipides, le métabolisme épigénétique et redox (81,159,162,188,189,263).

Des cochons d'Inde ayant reçu la NP ou une diète déficiente en nutriments soutenant la défense antioxydante en début de vie présentent des activités différentes des enzymes clés du métabolisme (glucokinase, phosphofruktokinase-1 et acétyl-CoA-carboxylase-1) à l'âge adulte, comparativement à un groupe témoin (263). La modulation de ces enzymes est associée au

développement de maladies métaboliques à l'âge adulte, tel que la stéatose hépatique (200,201,267), le cancer (203), ou le diabète (204,205).

Les enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN (ADN méthyltransférase) et synthèse de donneurs de méthyle (méthionine-adénosyltransférase) ont des résidus de cystéine sensibles au stress oxydatif et ses activités varient en fonction de la charge oxydative cellulaire (159,268). Chez le cochon d'Inde nouveau-né, la NP cause une hyperméthylation de l'ADN et une hypométhylation en âge adulte (81,269). La perturbation de la méthylation de l'ADN est alors soupçonnée d'être le facteur liant le déséquilibre de l'homéostasie redox en âge néonatal aux perturbations métaboliques à l'âge adulte.

Enfin, il est intuitif que les niveaux de glutathion et la signalisation redox modulent le métabolisme redox. Cette modulation se fait principalement par l'activation du facteur de transcription de la réponse antioxydante, Nrf2. Ce facteur de transcription est responsable de l'induction des gènes de la défense antioxydante telles que la glutamate-cystéine ligase (synthèse de glutathion) et la glutathion peroxydase (détoxification de peroxydes) (177). L'oxydation réversible des résidus des cystéines est un mécanisme par lequel le glutathion et le stress oxydatif modulent l'activité des enzymes de façon allostérique. Plusieurs protéines, notamment des facteurs de transcription NF- κ B (270), kinases et phosphatases (187,271) et enzymes du métabolisme énergétique (188,189) sont sensibles au stress oxydatif.

Il demeure donc important de confirmer et de caractériser l'impact du stress oxydant d'origine nutritionnelle (NP, ou déficience en vitamine C ou cystéine) en âge néonatal sur le potentiel redox du glutathion, et comment ce dernier affecte le métabolisme glucidique et lipidique et la méthylation de l'ADN à l'âge adulte. Pour ce faire, un modèle de cochon d'Inde nouveau-né est approprié pour l'étude vu son incapacité de synthétiser la vitamine C, son indépendance de la mère aux premiers jours de vie, et des stades de développement similaires à ceux de l'humain.

Hypothèse et objectifs

Hypothèse

Un stress oxydant tôt dans la vie postnatale induit une modification de l'homéostasie redox conduisant à une perturbation à long terme de la méthylation de l'ADN et du métabolisme de l'énergie de l'individu.

Objectif général

Caractériser l'impact à long terme de la NP néonatale sur l'homéostasie redox, la méthylation de l'ADN, et le métabolisme des glucides et lipides, en isolant chacun des facteurs nutritionnels (NP totale, peroxydes, déficience en vitamine C et déficience en cystéine).

Objectifs spécifiques

1— Étudier l'effet de la NP enrichie ou non en glutathion (en tant qu'anti-péroxydes *in vivo*) durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox et le métabolisme énergétique à 1 semaine et 4 mois de vie au foie des cochons d'Inde.

2— Étudier l'effet d'une diète déficiente en vitamine C et/ou cystéine reçue durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox, le métabolisme de l'énergie et la méthylation de l'ADN à 1 semaine et 3 mois de vie au foie des cochons d'Inde.

3— Étudier l'effet de la NP et des diètes déficientes en vitamine C et/ou cystéine reçues durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox et la méthylation de l'ADN à 1 semaine et 3 mois de vie aux poumons des cochons d'Inde.

Méthodes

Objectif 1

Étudier l'effet de la NP enrichie ou non en glutathion (en tant qu'anti-péroxydes *in vivo*) durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox et le métabolisme énergétique à 1 semaine et 4 mois de vie au foie des cochons d'Inde.

Quatre groupes de cochons d'Inde de 3 jours de vie ont été utilisés (n=16/groupe) :

- **Témoin** : diète standard pour cochons d'Inde. Il est reconnu que le stress oxydatif induit par la NP provient des peroxydes et des déficiences, mais aussi du stress subi durant la chirurgie pour le placement de cathéter. Cependant, l'équipe de recherche a précédemment démontré que les groupes nourris uniquement par voie orale, et ceux avec un cathéter placé dans leur veine jugulaire, mais sans infusion de NP et qui mangeaient oralement, ne présentaient aucune différence au niveau du stress oxydatif hépatique (272). Alors, afin de prévenir la détresse et la douleur non nécessaires, et en accord avec le principe de raffinement des protocoles de recherche, les animaux avec une diète orale étaient choisis pour constituer le groupe témoin.
- **Nutrition parentérale (NP)** : nutrition parentérale complète (2% (p/v) acides aminés (Primene, Baxter), Mississauga, ON, Canada), 8,7% (p/v) dextrose, 2% (p/v) préparation de multivitamines (Multi-12 pediatric; Sandoz), et des minéraux dans une seringue et des lipides 3.1% (p/v) (Intralipid 20%; Pharmacia Upjohn) dans la deuxième seringue. Cette nutrition contenait 0.57 Kcal/mL et était infusée à un débit de 0.8 mL/h pendant 23h/jour.
- **NP+6 μ M** : nutrition parentérale complète ajoutée de 6 μ M de glutathion en tant qu'anti-péroxyde afin d'isoler les effets de la NP qui ne sont pas causés par les peroxydes. L'effet anti-péroxyde du glutathion ajouté en solution de NP a déjà été démontré (265).
- **NP+12 μ M** : nutrition parentérale complète ajoutée de 12 μ M de glutathion. Cette dose, ainsi que celle de 6 μ M, ont été celles qui étaient capables de prévenir le stress oxydatif pulmonaire, la perte alvéolaire et la baisse du glutathion plasmatique (273).

Ces animaux ont reçu ces modes de nutrition jusqu'au 7^e jour de vie, quand la moitié ont été euthanasiés par exsanguination sous isofluorane. L'autre moitié des animaux a eu le cathéter noué (fermé) et a été alimentée avec une diète standard jusqu'à 4 mois de vie. Les animaux adultes ont été mis à jeun à la veille du jour de leur euthanasie, afin de réduire la variabilité sur les résultats causés par leurs différents états d'alimentation. La ligne du temps est illustrée dans la figure 9.

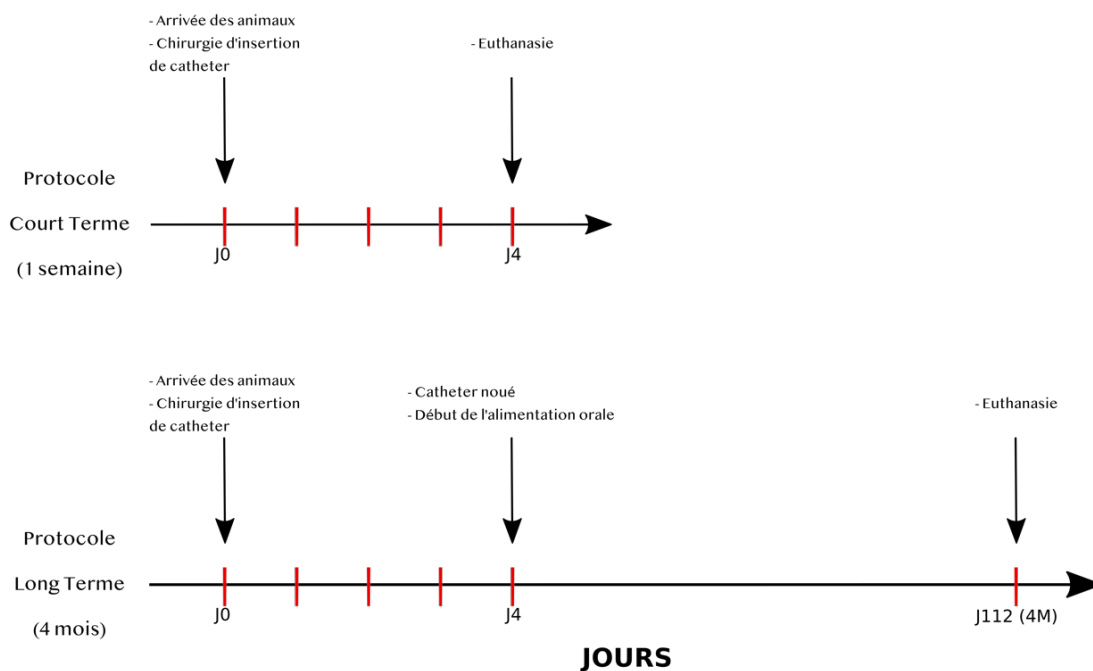


Figure 9 Ligne du temps du protocole animal de l'objectif 1.

Le choix du cochon d'Inde comme modèle expérimental dans cette étude est justifié par plusieurs raisons. Comme les humains, les cochons d'Inde ne sont pas capables de synthétiser la vitamine C, contrairement à d'autres espèces animales telles que les souris ou les rats. De plus, la gestation chez le cochon d'Inde est plus longue (environ 60 jours), et la taille de la portée est réduite par rapport à d'autres rongeurs. Ces caractéristiques sont partagées par les humaines ce qui en fait un modèle permettant d'étudier le développement périnatal (90,274,275).

Le développement périnatal du métabolisme énergétique chez le cochon d'Inde est également similaire à celui de l'humain. Le développement musculaire, hépatique et du tissu adipeux est principalement prénatal, tandis que l'activation des voies métaboliques hépatiques, telles que l'oxydation de lipides et la gluconéogenèse est un processus néonatal. Ce modèle est utilisé dans

plusieurs études de programmation métabolique à la suite d'insultes durant le développement (276,277). Le développement pulmonaire chez les cochons d'Inde se produit du début de la gestation jusqu'au début de l'âge adulte, avec la formation des alvéoles qui commence après 85% de la gestation, ce qui est un peu plus tard que chez l'humain (60%). Bref, chez le cochon d'Inde nouveau-né, le foie et les poumons se retrouvent dans les conditions de développement similaires à celle de l'humain (274).

Enfin, la phase adulte chez le cochon d'Inde commence à partir de 2 mois chez les mâles et 3 mois chez les femelles. Cette phase est caractérisée par la stabilisation de la croissance pondérale et la maturité sexuelle. Pour cette raison, l'âge adulte dans ces études était de 3 ou 4 mois(275).

Objectif 2

Étudier l'effet d'une diète déficiente en vitamine C et/ou cystéine reçue durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox, le métabolisme de l'énergie et la méthylation de l'ADN à 1 semaine et 3 mois de vie au foie des cochons d'Inde.

Quatre groupes expérimentaux de cochons d'Inde âgés de 3 jours ont été utilisés (n=16/groupe; 8 mâles et 8 femelles) :

- **Témoin** : diète standard;
- **Diète déficiente en Vitamine C**;
- **Diète déficiente en Cystéine**;
- **Diète déficiente en Vitamine C et Cystéine**.

Les diètes déficientes étaient dépourvues de vitamine C et/ou cystéine. Leurs compositions sont décrites dans [l'article qui décrit les résultats issus de ce protocole](#). Les animaux étaient sacrifiés selon les pratiques décrites dans l'objectif 1. Au 7^e jour de vie, la moitié de chaque groupe a été sacrifié, et l'autre moitié a mangé une diète adéquate et a été sacrifiée à l'âge de 3 mois. La ligne du temps de cet objectif est illustrée dans la figure 10.

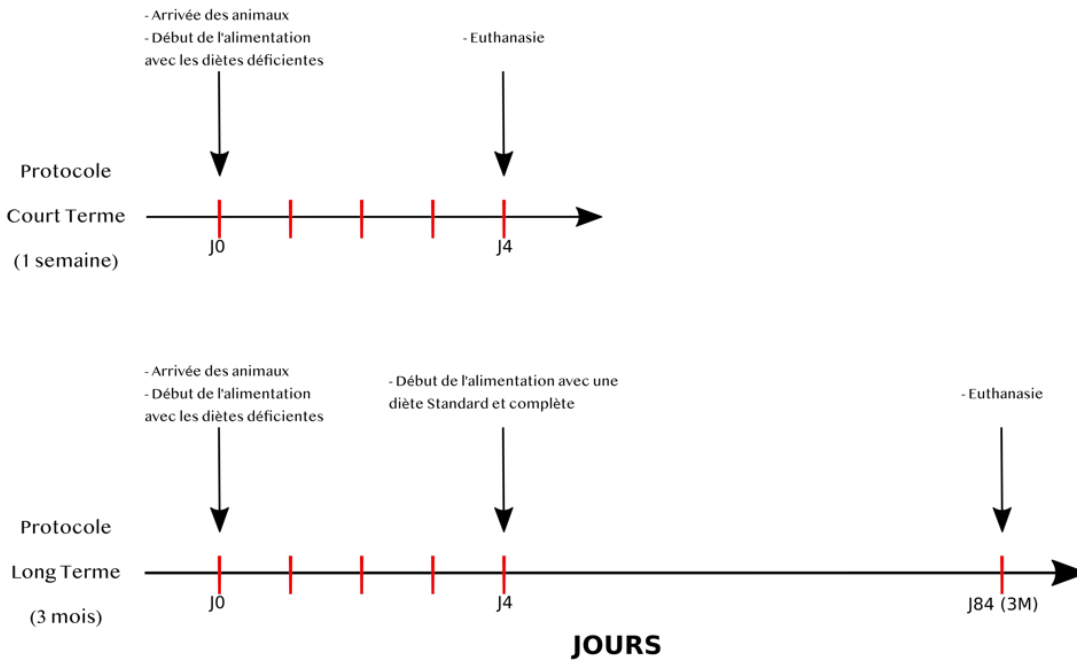


Figure 10 Ligne du temps du protocole animal de l'objectif 2.

Objectif 3

Étudier l'effet de la NP et des diètes déficientes en vitamine C et/ou cystéine reçues durant la première semaine de vie sur l'homéostasie redox et la méthylation de l'ADN à 1 semaine et 3 mois de vie aux poumons des cochons d'Inde.

Les poumons des animaux de l'objectif 2 ont été utilisés

Résultats

Réponse à l'objectif 1 - Neonatal parenteral nutrition affects the metabolic flow of glucose in newborn and adult male Hartley guinea pigs' liver

Neonatal parenteral nutrition affects the metabolic flow of glucose in newborn and adult male Hartley guinea pigs' liver

Published on the [Journal of Developmental Origins of Health and Disease](#).

Vitor Teixeira¹, Clémence Guiraut¹, Ibrahim Mohamed² and Jean-Claude Lavoie^{1,2}

¹Department of Nutrition, Université de Montréal, 2405 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1A8, Canada, and

²Department of Pediatrics-Neonatology, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada

Contribution

- Vitor Teixeira (40%): conceptualisation, investigation, formal analysis, writing of original draft.
- Clémence Guiraut (20%): investigation, project administration, reviewing and editing of manuscript.
- Mohamed I (10%): funding acquisition, reviewing, and editing of manuscript.
- Lavoie JC (30%): conceptualisation, methodology, project administration formal analysis, writing original draft, funding acquisition.

Corresponding author :

Jean-Claude Lavoie, PhD,

Research Centre, CHU Sainte-Justine,

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine,

Montreal, QC, H3T 1C5, Canada.

Email: jean-claude.lavoie@umontreal.ca

Received: 15 October 2019

Revised: 3 June 2020

Accepted: 28 June 2020

Abstract

Extremely premature birth is associated with a permanent disruption of energy metabolism. The underlying mechanisms are poorly understood. The oxidative stress induced by parenteral nutrition (PN) during the first weeks of life is suspected to reprogram energy metabolism in the liver. Full-term male Hartley guinea pigs (to isolate PN from prematurity) receiving PN enriched or not with glutathione (to isolate PN effects from PN-induced oxidative stress effects) or an oral nutrition (ON) during the first week of life were used. At 1 week (neonatal) and 16 weeks (adult), measurements of liver glutathione (GSH and GSSG) and activities of three key enzymes of energy metabolism (glucokinase (GCK), phosphofructokinase (PFK) and acetyl-CoA-carboxylase (ACC)) were performed. Differences between groups were reported if $p \leq 0.05$ (ANOVA). At one week, compared to ON, PN induced higher GSSG (oxidative stress), higher GCK activity and lower PFK & ACC activity; the glutathione supplement prevented all PN effects. At 16 weeks early-PN induced lower GSSG (reductive stress), lower GCK activity, which was prevented by added glutathione, and higher ACC activity independent of glutathione supplement. ACC was negatively associated ($r^2 = 0.33$) with GSSG. Increased NADPH levels confirmed the glucose-6-phosphate accumulation at one week, whereas our protocol failed to document lipid accumulation at 16 weeks. Conclusion: In adult male guinea pigs, neonatal exposure to PN affected glutathione metabolism leading to reductive stress (lower GSSG) and an altered metabolic flow of glucose. Partial prevention with glutathione supplementation suggests that, in addition of peroxides, other factors of PN are involved.

Keywords: Glutathione; Parenteral nutrition; Oxidative stress; Reductive stress; Metabolic reprogramming.

1. Introduction

There is increasing evidence of a relationship between extremely premature birth (less than 28 weeks of pregnancy) and lower weight and height in adolescence (1), higher blood pressure (2,3), change in glucose (2,4) and lipid metabolism (5) associated with a higher prevalence of diabetes and obesity in adulthood, compared to their counterparts full term infants. The causative agent of this metabolic reprogramming is not well defined. Due to their pulmonary and gastrointestinal immaturity, premature infants are exposed to increased oxidative stress caused by their clinical needs for supplemental oxygen and parenteral nutrition (PN), which is inherently contaminated with peroxides (6–8). Oxidative stress has also been shown to be an active factor contributing to pathological complications of prematurity such as bronchopulmonary dysplasia (9,10). Supplemental oxygen and peroxides from PN are two independent factors leading to the development of bronchopulmonary dysplasia (11,12). Thus, oxidative stress, caused by oxygen supplement or by peroxides, is suspected to cause the metabolic reprogramming because of its impact on epigenetic metabolism (13–15) and its direct implication in causing diseases of the premature newborns (9,15,16). In addition, a disruption of the hepatic lipid metabolism is reported in an animal model (17–19) where a modification of the activities of key enzymes (18) as well as the deposition of fat (17) were associated with the presence of these peroxides. In this context, we hypothesized that peroxides generated in PN and received by the newborns are a major factor leading to the long-term metabolic disturbance associated with extreme prematurity.

Recently, we have reported that oxidative stress associated with PN is prevented by the addition of glutathione to PN (20,21). This supplement enhances the animal's ability to detoxify peroxides (20). Therefore, this is an opportunity to separate the impacts of peroxide-related oxidative stress from the impact of PN by itself.

Glucose is the main source of energy for the body and the main source of carbon for nucleotides, amino acids, lipids, and others. An appropriate metabolic flow is essential for glucose to support development of the being and its health. Thus, a living organism can be considered as a thermodynamically open system in which the molecules evolve to become substrate for the next enzymatic reaction. The metabolic flow through an open system exists by the irreversibility of certain enzymatic actions. The orientation of the flow towards different metabolic pathways is

conditioned by the activity of key enzymes such as glucokinase (GCK), phosphofructokinase (PFK) and acetyl-CoA-carboxylase (ACC) which are well known to be the control points of energy metabolism.

Unlike other hexokinases, the activity of GCK is not limited by its enzymatic product glucose-6-phosphate; GCK plays a role of glucose sensor. Glucose-6-phosphate is the substrate for three main pathways: glycolysis, glycogen storage and the pentose phosphate pathway. The activity of PFK regulates the entry of glucose-6-phosphate into glycolysis, generating ATP and ultimately producing acetyl-CoA. ACC is a well-known limiting step of *de novo* lipogenesis by converting acetyl-CoA to malonyl-CoA, an intermediate in this pathway. In addition, malonyl-CoA inhibits carnitine palmitoyl transferases that transfer fatty acids to mitochondria for their oxidation, thereby promoting lipid accumulation.

The objective was to study separately the effects of PN received early in life and the oxidative stress induced by peroxides contaminating this PN on long-term energy metabolism. Therefore, the oxidative stress and hepatic activity profiles of three key enzymes of the energy metabolism (GCK, PFK and ACC) were measured immediately and 15 weeks after the glutathione-enriched or non-enriched PN infusions received during the first week of life.

2. Materials and Methods

All chemical products were purchased from Sigma-Aldrich, Fischer Scientific, Roche Diagnostics, Bio-Rad laboratories, or MP Biomedicals, unless otherwise stated.

Experimental procedures

The study aims to describe the long-term impact of neonatal PN on hepatic metabolism involved in energy substrates (glucose and lipids). Therefore, the reference group consisted of animals of same age but without manipulation (no catheter) and fed with regular guinea pig food; this group was named Oral Nutrition (ON). We recognize that the oxidative stress associated with PN, comes from the peroxides that contaminate the intravenous solution, but also from the stress intrinsically induced by the fixation of a jugular vein catheter. We have previously reported a lack of difference between the ON group and the sham group (animals with a knotted catheter, and nourished orally) on hepatic oxidative stress (22). This practice is in accordance with the principle of refinement of

animal use in research. The purpose of adding glutathione to PN is to reduce the oxidative stress induced by peroxides.

Guinea pigs were previously proposed as a model to study the developmental origins of health and disease (22). Each week, four Hartley male guinea pigs born at term and 3 days old were received from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). The animals, housed under standard conditions in a 12/12 hrs light/dark cycle, were randomly assigned to the following four groups (13-15 animals per group):

- Parenteral Nutrition (PN): parenterally infused by a catheter inserted into the jugular vein on the third day of life. As previously described (17,20,23), the PN solutions were administered via 2 syringes connected by a Y-tube and delivered at a flow rate of 0.4 mL/h each (total flow rate of 0.8 mL/h). One solution consisted of 2% (w/v) amino acids (Primene 10%; Baxter, Mississauga, ON, Canada), 8.7% (w/v) dextrose, 2% (v/v) multivitamin preparation (Multi-12 pediatric; Sandoz, Montreal, QC, Canada) and 1U/mL heparin. The other solution contained amino acids and dextrose at the same amounts, and the lipid emulsion at 3.1% (w/v) (Intralipid 20%; Pharmacia Upjohn, Baie d'Urfé, QC, Canada).
- PN + 6 μ M and PN+12 μ M: PN was enriched with GSSG at 6 or 12 μ M. It was demonstrated previously that intravenous GSSG reduced the oxidative stress caused by PN peroxides (20). Indeed, in plasma, both forms of glutathione (GSH and GSSG) have a similar affinity for γ -glutamyltranspeptidase (24), the first enzyme in the cascade leading to tissue enrichment in GSH (20). GSSG has a better stability (15% lost in 24 hours) than GSH (half-life of 3 hours) in PN.
- Oral Nutrition (ON): with *ad libitum* standard guinea pig food at all times (2041-Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet (2.4kcal/g; 50% energy from carbohydrates; 18% from fat and 32% from protein), Harlan, Montréal, QC, Canada).

Four days later, at the age of 1 week, half of the animals in each group were sacrificed, while the catheters of the other animals were knotted, and from then on, they were fed orally with standard guinea pig food until the age of 16 weeks. At these ages, 1 and 16 weeks, the animals were sacrificed by exsanguination under isoflurane anesthesia, after a 16 hrs night fast. The liver was flushed with NaCl 0.9%, removed, prepared and stored at -80°C until biochemical determinations.

All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, and the study protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of the CHU-Sainte-Justine Research Centre (protocol #672).

Biochemical assessments

GSH and GSSG. Five hundred mg of freshly collected liver were homogenized in 5 volumes of 5% (w/v) metaphosphoric acid and centrifuged at 7200g/3 min; the supernatant and the pellet were stored at -80°C. The GSH and GSSG species in supernatants were separated in a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) and quantified by absorbance at 200 nm, as previously described (18,25). Total proteins were measured in pellets by the Bradford method using albumin for the standard curve, as previously described (26). Data are expressed in nmol/mg protein but also in proportion of oxidized glutathione on total glutathione, GSSG being counted as 2 GSH ($2 \times \text{GSSG} / [2 \times \text{GSSG} + \text{GSH}]$).

GCK Activity. Five hundred mg of liver were thawed on ice, and homogenized at 4° C with tissue tearor (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in 2 volumes of buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA- Na_2 , 5 mM MgCl_2 , 150 mM KCl and 10 mM 2-mercaptoethanol) and centrifuged at 1400g/20 min/4° C. The assay was performed on the supernatant as previously described (27) in the presence of 0.5 mM ATP, 0.4 mM NADP, 0.2U G6PDH / 200 μg protein, and 0.5mM or 100mM of glucose added to the buffer 100 mM Tris-HCl pH 7.5 +, 5 mM MgCl_2 during one hour at 30°C. The generated NADPH was measured in a spectrophotometer at 340nm. The activity at 0.5mM glucose (hexokinase) was subtracted from that at 100mM (hexokinase + glucokinase). Data are expressed as U (nmol of NADPH \cdot min⁻¹ \cdot mg of protein⁻¹).

PFK Activity. Tissues were thawed on ice and homogenized by the method proposed by Hamer and Dickson (28) and assayed as described by Karadsheh (29) without DTT in reaction buffer. Briefly, the enzyme reaction was coupled with that of aldolase, triose phosphate isomerase and GAPDH, and the consumption of NADH was measured in a spectrophotometer at 340 nm during 12 minutes at ambient temperature. Data are expressed as U (nmol of NAD \cdot min⁻¹ \cdot of protein⁻¹).

ACC Activity. After thawing, ACC was extracted by precipitation with increasing concentrations of polyethylene-glycol-8000, as described by Kudo (30). Twenty-five μg of protein from the suspension were pre-incubated in reaction buffer (60 mM Tris-Acetate pH 7.5, 1 mg/mL BSA, 1.3

μM 2-mercaptoethanol, 2 mM ATP, 1 mM acetyl-CoA, 5 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ for 20 min at 37°C . The reaction was started by the addition of 1.64 mM $\text{NaH}^{14}\text{C}[\text{O}_3]$ (1.35 μCi of 5 mCi/mmol) and 16.6 mM of NaHCO_3 , and was stopped by the addition of perchloric acid and samples centrifugation at 1100g/20 min. The incorporation of ^{14}C into malonyl-CoA in the supernatant was measured using a scintillation counter (HIDEX, Turku, Finland). Data are expressed as U (nmol of malonyl-CoA \cdot min $^{-1}$ \cdot mg of protein $^{-1}$).

GCK and PFK Western Blot. GCK and PFK were blotted as previously described. The primary antibodies were: GCK (mouse anti-human GCK polyclonal antibody, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) or PFK (mouse anti-human PFK-1 monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:1000 dilution. Membranes were subsequently incubated with anti-mouse IgG-HRP antibody (1:2500 dilution) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Blots were revealed by chemiluminescence (Supersignal West Pico, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in an imaging system (G: BOX, Synoptics, Cambridge, UK), and densitometry was analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Vinculin was used as a control protein (mouse anti-human VCL monoclonal antibody, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). Data are expressed as the ratio of density of the target protein to vinculin density. All gels contained samples from all groups. However, the bands from the ON group on the images presented were cut and transferred to the left of the same image to match the graphical representation. There was no statistical difference between groups for vinculin density.

Western Blot of ACC and ACC-P [Ser79]. Tissue was homogenized as previously described (18). The supernatant (30 μg of protein) in Laemmli's buffer (31) was resolved in SDS-PAGE (4%/6%) 170 V/70 min/ 4°C and transferred to a PVDF membrane 100V/70 min. Membranes were blocked with skim milk in phosphate-buffered-saline-Tween-20, and subsequently incubated with primary antibodies: ACC (rabbit anti-human ACC-1 polyclonal antibody, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or ACC-P (rabbit anti-human phospho-ACC-P-Ser79 polyclonal antibody, Millipore, Burlington, MA, USA) at 1:1000 dilution. Then, membranes were incubated with a secondary antibody (anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Promega, Madison, WI, USA) at 1:2500 dilution. Vinculin was used as a loading control and images were taken and analyzed as described above. Because of limited amount of tissue for 1-week-old animals, ACC-P blotting was only performed in 16-week-old animals. ACC-P levels are reported as the ratio between ACC-P and ACC.

Plasma Triacylglycerols. Plasma was obtained by centrifugation of whole blood on K₃-EDTA (7200g/4 min). Triacylglycerols levels were measured by a Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Data are expressed as millimolar concentrations.

NADPH. Ten milligrams of liver were homogenized in a glass potter tube with 20 μ L of KOH 50mM. Next, 120 μ L of methanol, 30 μ L of chloroform and 90 μ L of water were added, interspersed with vigorous agitation. Samples were then centrifuged (7200g/5 min) and the upper layer was used for NADPH determination and protein was measured in the middle protein disk by the Bradford method (26). NADPH was then measured in a buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, EDTA-Na₂ 0.1 mM, L-Serine 10 mM, Sodium Borate 20 mM) with addition of GSSG 5mM and DTNB 6mM in a 96-well plate. Twenty microliters were added to 160 μ L of buffer and absorbance at 412 nm was measured. The addition of 4 μ L of GSSG-reductase (final concentration of 13 μ g protein/ μ L) initiated the reaction of NADPH consumption. The absorbance at 412 nm after 10 min of reaction was subtracted from the one before the addition and extrapolated through a standard curve of NADPH. The increase in density is directly proportional to the concentration of NADPH in the medium. Data are expressed as nmol of NADPH/ mg of protein.

Oil red stain. Livers were sectioned into five slides of 5 μ m, each separated by at least 150 μ m into the liver block, in order to obtain sections at different depths. Slides were stained with Oil Red and Hematoxylin from Oil Red O Stain Kit (ab150678) (Abcam Plc, ON, Canada) as described previously (21). Briefly, liver sections were placed in 10% formalin, rinsed with distilled water, 100% propylene glycol, oil red, 85% propylene glycol, rinsed in distilled water, placed in hematoxylin and rinsed in running water then distilled water. Slides were photographed under a 20x magnification in the microscope. Images were split into CMYK channels, and cyan images (nuclei) were subtracted from magenta images (lipid droplets and nuclei), in order to detect lipids in the images. The subtracted images were then transformed into grayscale and an intensity threshold of black (22-255 for 1-week animals and 28-255 to 16-week animals) was applied to separate non-specific detection of lipid droplets. Thresholds were adjusted according to age in order to avoid non-specific detection caused by the high staining intensity in livers of 16-week animals. Particles with size between 0-600 μ m², and with any circularity were detected. Results are shown in squared micrometers per field (Field total area = 275 702 μ m²). No within-subject statistical

differences were observed among the five liver sections analyzed following Friedman's ANOVA ($p=0.74$).

Glucose Tolerance Test (GTT). One week before sacrifice, adult animals were submitted to a glucose tolerance test after 16h of fasting. Animals had their ear capillaries punctured for fasting glucose concentrations. Then, an intraperitoneal injection of 2mL/Kg of a 50% w/v solution of glucose was performed, and blood was collected every 30 min, until 2h30 after injection. The blood was analyzed with a glucometer (Contour next glucometer; Bayer, Mississauga, Canada) and data are reported in mM.

Insulin. Plasma was obtained by centrifugation of whole blood on K₃-EDTA (7200g/4 min). Insulin concentrations were measured by a competitive ELISA kit (Guinea Pig Insulin ELISA kit; LSBio LifeSpan BioSciences, Inc.; Seattle, USA). Data are reported in ng of insulin / μ L of plasma. HOMA-IR, a measure of insulin resistance, was calculated with insulin and fasting glucose concentrations.

Statistics. All data are presented as mean \pm S.E.M. Data from the four groups in both ages were orthogonally compared by ANOVA or factorial ANOVA. These comparisons are represented in the figures by bars uniting the concerned groups. In case of significant interaction with the age of animals, the comparisons were made according to age. To respect homoscedasticity, tested by Bartlett's Chi², mathematical transformation (square root) was used for the GSH, GSSG, GCK activity, NADPH, plasma TAG and liver lipids values. Pearson's linear correlation was used to quantify the relationship between the logarithmic value of ACC activity or the ratio of the protein level of ACC-P to ACC and the level of GSSG. The significance threshold was set at $p \leq 0.05$.

For global appreciation of glucose flow and how it is affected by PN and glutathione supplementation, values from enzyme activity (GCK, PFK and ACC), NADPH, liver lipids and plasma triglycerides were transformed into a Z-score. The pooled mean and standard deviation of all animals (both ages and groups) were used. This resulted in a range of Z-scores from -1.16 to +1.09. Mean Z-scores were calculated for each group of each age and then categorized into 6 intervals of 0.5 SD each. A color ranging from yellow to blue was assigned to each interval. When put together, each color generated a heat map that was used to create a colored metabolic pathway.

3. Results

Initially, 66 animals were used for the study, 18 as controls and 48 as PN groups. Five animals in PN groups deceased from complications of the catheter insertion surgery (2 in PN, 2 in PN+6 μ M and 1 in PN+12 μ M). At 3 days of life, animals had mean body weight of 108 \pm 2g (n=61). At 1 week of life, after PN infusion, the percentage change of bodyweight from day 3 was significant for the control group (+18 \pm 3%, p<0.01) and the PN group (-4 \pm 1%, p<0.01), but was not significant in the PN+6 μ M (-0.2 \pm 2%) and PN+12 μ M (+3 \pm 2%) groups, meaning glutathione supplementation was able to reduce the usual weight loss observed even in clinical situation in the first week of infusion. This weight loss has already been observed in animal models of PN. Between week 2 and 9 (**Figure 1**), body weight was lighter in the PN groups compared to the ON group ($F_{(1,24)} > 6.97$; p<0.05). However, the mean growth rate (62 \pm 2 g/ week) was not statistically different between the groups during this period ($F_{(1,24)} < 0.94$). Although the difference in body weight disappeared between the 10th and 16th weeks, the mean growth rate was higher in the PN groups than in the ON group (36 \pm 2 vs. 30 \pm 3 g/ week; $F_{(1,24)} = 4.13$; p=0.05). At one week, liver weight, relative to bodyweight, did not differ among groups (3.4 \pm 0.1%). Bodyweight and relative liver weight were not statistically different among 16-week old groups (784 \pm 12g and 2.8 \pm 0.04%, respectively).

3. 1- Glutathione

Figure 2a shows results for GSH. There was no interaction between groups and ages ($F_{(3,50)} = 1.95$) or between groups ($F_{(1,50)} < 0.84$). The levels were higher in animals aged of 16 weeks compared to those of 1 week ($F_{(1,50)} = 40.1$; p<0.0001). However, the interaction between groups and ages was significant ($F_{(3,53)} = 8.56$, p<0.001) for GSSG (**Fig 2b**), meaning that the pattern observed at 1 week is not maintained at 16 weeks. In fact, for 1-week animals, there was no difference in GSSG levels between ON animals and those receiving PN+glutathione (6 or 12 μ M) ($F_{(1,53)} < 0.1$), while they were lower than those of the PN group ($F_{(1,53)} = 11.79$, p<0.001). In 16-week-old animals, there was no difference in GSSG levels between the three PN groups (with or without glutathione) ($F_{(1,51)} < 1.30$), they were lower than the value measured in the ON group ($F_{(1,51)} = 20.52$, p<0.0001). The proportion of oxidized glutathione (**Fig 2c**) followed the same changes that for GSSG values. Indeed, there was a significant interaction ($F_{(3,51)} = 5.95$, p<0.001) between groups and ages. At 1 week, there was no difference in proportions of oxidized glutathione between ON animals and those receiving PN+glutathione ($F_{(1,51)} < 0.23$), while they were lower than those of the PN group ($F_{(1,51)} = 9.96$, p<0.01). In 16-week-old animals, there was no difference

between the three PN groups ($F_{(1,51)} < 0.87$), the proportions of oxidized glutathione were lower than the value measured in the ON group ($F_{(1,51)} = 14.3$, $p < 0.001$).

3.2 – Glucokinase:

An interaction was significant between ages and groups ($F_{(3,49)} = 8.04$, $p < 0.001$) on GCK activity (**Fig 3a**). Immediately after PN infusion, at 1 week of age, a statistically significant difference between the PN+6 μM GSSG and PN+12 μM GSSG groups ($F_{(1,49)} = 10.3$, $p < 0.002$) was found. However, they did not differ from the ON group ($F_{(1,49)} = 0.33$). The overall activity of these 3 groups was lower than that observed in the PN group ($F_{(1,49)} = 6.14$, $p < 0.02$). At 16 weeks, early life PN decreased GCK activity in PN group ($F_{(1,49)} = 4.95$, $p < 0.03$). Overall, adding glutathione to PN was able to restore GCK activity because the two PN+GSSG groups were not different from the ON group ($F_{(1,49)} = 0.08$).

There was no significant interaction ($F_{(3,51)} = 1.29$) between age and groups relatively to GCK protein levels (**Fig 3b**). There was a significant difference between PN+6 μM GSSG and PN+12 μM GSSG group ($F_{(1,51)} = 7.23$, $p < 0.01$), but GCK protein levels did not differ from the PN group ($F_{(1,51)} = 0.50$). The protein levels were higher in ON group compared to all PN groups ($F_{(1,51)} = 5.90$, $p < 0.01$). There was no difference between the young and older animals ($F_{(1,51)} = 0.73$).

3.3 – Phosphofructokinase:

The statistical analysis showed a significant ($F_{(1,49)} = 4.37$, $p < 0.05$) interaction between ages and groups on PFK activity (**Fig 4a**). At one week, the activity was lowest in the PN group ($F_{(1,49)} = 7.46$, $p < 0.01$) because the values were similar between the PN+GSSG groups and the ON group ($F_{(1,49)} < 3.76$). At 16 weeks, differences between groups did not reach the statistical significance ($F_{(1,49)} < 2.21$).

There was no interaction for protein levels of PFK (**Fig 4b**) between parameters ($F_{(3,53)} = 0.72$). The levels were similar between the three PN groups ($F_{(1,53)} < 0.4$), lower than levels measured in orally fed group ($F_{(1,53)} = 9.74$, $p < 0.003$) The relative PFK protein levels were higher at 16 weeks of age compared to one week ($F_{(1,53)} = 19.6$, $p < 0.0001$).

3.4 – Acetyl CoA carboxylase:

The impact of early PN on ACC activity (**Fig 5a**) differed depending on the time of analysis, immediately after PN (at 1 week) or at 16 weeks. The same effect was also found for GCK. Indeed,

the interaction was significant ($F_{(3,49)} = 7.34$, $p < 0.0005$). At 1 week, the ACC activity was higher in the 12 μM GSSG group compared to the 6 μM GSSG group ($F_{(1,49)} = 8.69$, $p < 0.005$), both higher than the activity observed in the ON group ($F_{(1,49)} = 4.72$, $p < 0.05$), all were higher than the activity measured in the PN group ($F_{(1,49)} = 35.5$, $p < 0.0001$). At 16 weeks, there was no difference between all three PN groups ($F_{(1,49)} < 3.23$), regardless of glutathione supplementation. All three groups had higher ACC activities than those measured in the ON group ($F_{(1,49)} = 11.19$, $p < 0.005$).

Significant negative correlations were found between the activity of ACC and GSSG level (ACC: $y = -2.41 \ln(\text{GSSG nmol} \cdot \text{mg of protein}^{-1}) + 4.64$; $r^2 = 0.33$, $p < 0.001$). This correlation analysis included all data from 1 and 16 weeks animals (**Fig 6a**), Similarly, phosphorylation of ACC in Ser79 was positively correlated with GSSG (ACC-P[Ser79]/ACC: $y = 0.65 \cdot (\text{GSSG nmol} \cdot \text{mg of protein}^{-1}) + 0.71$; $r^2 = 0.20$, $p < 0.05$) (**Fig 6b**).

Similarly, the interaction was significant ($F_{(3,53)} = 3.05$, $p < 0.05$) for the protein levels of ACC between ages and groups (**Fig 5b**). At 1 week of age, there was no difference between all three PN groups ($F_{(1,53)} < 1.61$). PN groups had lower ACC protein levels than ON group ($F_{(1,53)} = 5.19$, $p < 0.05$). At 16 weeks, there was no difference between ON group and the PN+6 μM or PN+12 μM groups ($F_{(1,53)} < 2.65$), overall they were higher than the measured activity in PN group ($F_{(1,53)} = 4.80$, $p < 0.05$).

At 16 weeks, the ratio of phosphorylated ACC on total ACC protein (**Fig 5c**) was not different neither between PN+6 μM and PN+12 μM ($F_{(1,24)} = 0.40$), nor between PN+glutathione and PN ($F_{(1,24)} = 0.31$). However it was decreased in all three PN groups, compared to ON group ($F_{(1,24)} = 6.69$, $p < 0.05$).

3.5 -NADPH

An increase in NADPH levels in 1 week animals receiving PN (with or without glutathione), relatively to ON was observed ($F_{(1,48)} = 4.55$, $p < 0.05$). No differences were observed in 16-week animals (**Fig 7d**).

3.6 - Liver Lipids

Due to the difference in staining intensity and pattern of hepatic lipids between 1 and 16 weeks, ANOVA was performed separately for each age. At 1 week, there was no difference in the histological areas stained with red oil (μm^2)/field between the PN+GSSG groups and the ON group

($F_{(1,24)} = 1.47$). However, the areas were 60% higher in the PN group ($F_{(1,24)} = 6.92$, $p < 0.05$). Even if the areas stained with red oil were 5 times greater at 16 weeks compared to the areas measured at one week, there was no difference between these groups ($F_{(1,24)} < 2.66$) (**Fig 7a and b**).

3.7 - Plasma TAG

Similar to the staining of lipids, plasma TAG were analyzed by ANOVA performed separately for each age. At 1 week of life, no difference was observed among groups receiving PN, regardless of glutathione supplementation ($F_{(1,24)} < 0.07$). Plasma TAG was 25% lower for all three PN groups, compared to ON group ($F_{(1,24)} = 4.39$, $p < 0.05$). At 16 weeks, no comparison reached the statistical significance ($F_{(1,24)} < 3.66$) (**Fig 7c**).

3.8 - Insulin glucose, GTT and HOMA-IR

No differences were observed for fasting plasma glucose at 16 weeks (5.4 ± 0.2 mM; $F_{(1,24)} < 1.12$). At 1 week, the level of insulin, measured in a small number of animals ($n=3-4$ /group), was higher ($F_{(1,10)} = 24.6$, $p < 0.001$) in the PN±GSSG groups (2.45 ± 0.12 ng / ml plasma) compared with ON group (1.67 ± 0.17 ng / ml plasma). There was no difference ($F_{(1,24)} < 1.13$) between groups at 16 weeks (2.22 ± 0.11 ng / ml plasma). Areas under the curve (AUC) following GTT were not significantly different among groups (NP: 2194 ± 85 ; NP+6 μ M: 1879 ± 144 ; NP+12 μ M: 2324 ± 111 ; ON: 1988 ± 122 relative units; $F_{(1,20)} < 2.85$). Similarly, HOMA-IR values were not statistically different (NP: 16 ± 1.2 ; NP+6 μ M: 15 ± 0.9 ; NP+12 μ M: 13 ± 0.7 ; ON: 15 ± 2.4 relative units; $F_{(1,23)} < 0.53$).

4. Discussion

The study supports the hypothesis that PN received early in life would have a long-term impact on the energy metabolism. Depending on the key enzymes studied, causal agents were different. GCK activity appears to be affected by peroxides contaminating PN, with glutathione supplementation preventing the impact of PN. ACC activity appears to be independent of peroxides, since glutathione supplementation did not prevent the impact of PN. Long-term PFK activity was not influenced by PN or PN enriched with glutathione. The specificity of the reprogramming of GCK activity by peroxides was also highlighted by the lack of relationship with hepatic GSSG levels, in contrast to ACC activity. Although early exposure to peroxides influenced

the short-term levels of liver GSSG, the long-term level of GSSG depended on the PN received during the first week of life and not on early exposure to peroxides.

Significant interactions between ages (at one week -immediately after infusion of PN- and at 16 weeks -15 weeks after cessation of PN) and the modes of nutrition (PN and ON) suggest that the impact of PN components, including peroxides, have different targets according to the age. It was not surprising to observe a change in glutathione and enzymatic activities during PN infusion (increased GSSG, increased GCK activity, decreased PFK, decreased ACC activity). A direct impact of PN components was expected. The PN imprint on metabolic flow observed 15 weeks after the end of the infusion suggests that its components also interact with the epigenetic metabolism, which leads to a reprogramming of the metabolism. These interactions with the epigenetic process should be the subject of future studies.

Glutathione supplementation prevented the *in situ* glutathione oxidation observed in the PN group compared to the ON group, as evidenced by the lower GSSG and proportion of oxidized glutathione, suggesting better detoxification of peroxides. The data are consistent with previously reported results in the lungs of this animal model with a 10 μ M glutathione supplement in PN (20). Glutathione supplementation also prevented metabolic changes induced by early PN, measured immediately after PN at one week of life (GCK, PFK and ACC) and 15 weeks after cessation of PN for GCK activity.

Enzyme activity may depend on its level of protein. Immediately after PN, the relative (to vinculin) protein levels for each enzyme measured in all PN (\pm GSSG) groups were lower than that observed in the ON group. The lack of effect of the glutathione supplementation suggests that the divergence was not related to PN-induced oxidative stress, but could be explained by the difference in nutrition mode or by other factors intrinsically related to PN. Fifteen weeks after cessation of PN, the protein levels of the three enzymes remained lower in the PN group compared to the ON group, also suggesting a reprogramming of the metabolism leading to their gene expression. However, the inconsistency between enzymatic activities and their protein levels strongly suggests that a difference in protein expression is not enough to explain the changes in enzymatic activity. These changes could be induced by other regulating mechanisms.

The results show a significant correlation between ACC activity and liver GSSG values; the higher the GSSG, the lower the activity. Therefore, a structural modification of the enzymes, or

their regulatory mechanism, following disulfide bond formation was suspected. The activity of the carboxyltransferase part of the enzyme depends of the redox status of a sensitive thiol (32). On the other hand, the significant and positive correlation between ACC-P [Ser79] levels and GSSG values in the liver suggests that early PN has to reprogram the mechanism for regulating ACC activity such as the tandem AMPK and PP2A. The activity of PP2A depends on the redox status of two critical cysteinyl residues whose oxidation is associated with the inhibition of its activity (33). Thus, in a reductive environment such as that present in the PN groups, (GSSG lower than in the ON group), PP2A can be expected to be more active, allowing a lower level of ACC-P and greater ACC activity.

The activity of GCK depends of the availability of glucose. During PN administration, glucose infusion was constant at 19.3 mmol/hr. The higher insulin level in the PN groups compared to the ON group suggests higher glucose supply in these groups. However, for a similar supply of intravenous glucose, animals receiving glutathione supplementation had a lower GCK activity, thereby eliminating the possibility that these results are due to a difference of circulating glucose. The low activity of GCK observed 15 weeks later could be explained by lower blood glucose as previously reported as a long-term consequence of an early PN in guinea pigs (34). However, here, there was no significant difference between groups for blood glucose and insulin level in these fasted animals. On the other hand, GCK activity is also dependent of the redox status of thiol groups close to the active site (35,36), whose oxidation is associated with an inhibition (35). Peroxides induce the oxidation of the thiol function of cysteinyl residues in proteins into sulfenic acid (37) or induce the oxidation of GSH into GSSG through glutathione peroxidases. GSSG participates in the formation of the disulfide bond between two cysteinyl residues or between a cysteinyl residue and glutathione (38,39), also modifying the activity of the protein. PFK is inhibited this way (40). However, contrary to what was expected, the study reports a greater activity in an oxidative condition at one week and lower activity in a reductive environment at 16 weeks of age. These changes in GCK activity in PN group, relatively to ON group, were prevented by the glutathione supplement, both at 1 and 16 weeks. However, the lack of correlation with hepatic GSSG confirmed the absence of redox influence on GCK activity. Therefore, other factor than blood glucose level or redox status is suspected to influence the programming of GCK activity; this PN-related factor is absent or ineffective in animals supplemented with glutathione. This change in GCK activity

could be related to its association with lipid accumulation as already been reported by RM O'Doherty et al (41) using overexpression of GCK in rats.

Compared with the ON group, hepatic GSSG was higher immediately after PN infusion and lower 15 weeks later. Glutathione supplementation prevented the increase of hepatic GSSG at one week, suggesting that peroxides infused with the PN favor GSSG production. At 16 weeks, the low level of GSSG observed in the PN groups was not influenced by the supplementation, suggesting the involvement of another PN-related factor, different from peroxides. If the long-term changes were caused by epigenetic modification, this could result from a loss of vitamin C in the PN groups (40,42), which leads to a lower hepatic concentration of ascorbate (43); this vitamin being essential to DNA demethylation (44,45).

Thus, the metabolic flow of glucose (**Fig 8**) differs according to the mode of nutrition, PN or ON. During PN, the higher GCK and lower PFK activity could favor the accumulation of glucose-6-phosphate, which can be used as substrate for the glycogen synthesis pathway or the pentose phosphate pathway generating NADPH. We chose to measure NADPH since it is involved in the redox state of the cells. The higher level of NADPH in the PN group confirms this accumulation, which was prevented by the glutathione supplement. The addition of GSSG in PN also prevented modification in GCK and PFK activity. *In vivo*, these enzymes are not saturated with substrate. Thus, the increased availability of glucose-6-phosphate could lead to a greater glycolysis, with, ultimately, a greater availability of substrate for ACC; which could also lead to a higher lipid content in the liver, as observed histologically. However, the decrease in PFK activity observed in PN group at 1 week of life could limit this flow. In a previous study using the same animal model, PN-induced hepatic steatosis was associated with the presence of the multivitamin preparation in PN (17), which, in absence of photo-protection, leads to generation of peroxides (43). Taking into account the lower level of plasma triacylglycerol in the PN group, this steatosis could be explained, at least in part, by a defect in lipid release by the liver. In utero, the energy metabolism favours accumulation of lipids (46,47). After birth a transition occurs toward a greater utilization of lipids to generate energy. Therefore, the fatty liver phenotype present at birth disappears within a few days or weeks, depending on the species (48–52). In the light of the present results, we can hypothesize that the peroxides contaminating the PN reduce the translocation of hepatic fatty acids to the mitochondria, limiting the production of ATP. Fifteen weeks after the end of PN, the pattern of metabolic flow was reversed in animals that received early PN. GCK activity was lower and

ACC activity was higher than activities measured in the ON group, with no significant change in PFK activity. With increased ACC activity, one would expect to observe a change in the deposit of lipid in the liver or plasma. There was an accumulation of lipids in both compartments depending on age. Compared to 1 week, histology performed at 16 weeks revealed 5 times more lipids per surface area in the liver, and plasma containing 2-3 times more triacylglycerol. The lack of difference between the ON and PN groups could be explained by a lower GCK activity combined with a greater ACC activity in the PN groups. This observation occurred at a specific time in the animal's life, here at 16 weeks. These values may not be representative of the current metabolic change. Indeed, as shown in Figure 1, from the 10th week of life, the growth rate is 20% higher in the PN groups than in the ON group, thus compensating for the growth retardation observed during the first 10 weeks of life. It would have been interesting to have additional data from older animals to better assess the biological relevance of this trend. In fact, the clinical importance of this permanent change in the metabolic flow of glucose induced by PN could be further demonstrated by a diet rich in sugar and over a longer lifespan; a study to be undertaken.

Relationships between extreme prematurity and clinical outcomes, such as glucose intolerance, non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular health later in life, are increasingly being reported (53). Their metabolic explanations are more difficult. Because PN received by all these newborns is contaminated with peroxides (7,54), we have suspected the impact of this mode of nutrition. Thus, our study separated parenteral nutrition from prematurity. The results confirm that, as currently administered, PN could explain some of the reported relationships between extreme prematurity and the metabolic health of prematurely born adults. Indeed, the early administration of a conventional PN induced changes in metabolic flow of glucose as observed 15 weeks after the end of the PN. In one-week-old ON animals, the metabolic flow from glucose to lipids is characterized by 1) a relatively low GCK activity (5 ± 1 U), limiting the availability of the substrate for glycolysis, and 2) a high ACC activity (9.6 ± 0.4 U), promoting lipid synthesis. At 16 weeks of age, the flow is characterized by 1) a high GCK activity (14 ± 2 U) and 2) a low ACC activity (3.2 ± 0.2 U), suggesting that the intermediate molecules from glycolysis are used in other metabolic pathways, such as the Krebs Cycle. Differently from ON animals, animals on PN showed 1) a GCK activity twice as high at one week of life (11 ± 3 U), which remained similar until 16 weeks (9 ± 4 U), and 2) a ACC activity 30% lower (6.9 ± 0.3 U) at 1 week, further decreasing by 35% up to 16 weeks (4.5 ± 0.3 U). This observation suggests that, during the first week of age, PN favored a

certain maturation of the metabolic flow of glucose, which however remains immature at 16 weeks compared to ON animals. These modifications observed with PN have been corrected at least in part by glutathione supplementation, suggesting a role for the peroxides contaminating PN. Compared to ON animals, at 16 weeks, the lower GCK activity and the higher ACC activity in PN animals suggest a metabolic disturbance that could affect blood glucose and lipid metabolism, which an unfavorable environment could reveal.

Too few studies aim to elucidate the long-term impact of neonatal nutrition, especially PN, over metabolic outcomes during adulthood. Other studies have yet to confirm our conclusions and further clarify the mechanisms involved. It has been suggested that the long-term impact on metabolism or diseases such as stress-related asthma at the start of life, or low birth weight may differ according to the sex of the newborn (55,56). In addition, the antioxidant capacity of newborns, in particular of premature infants, is known to be sex-specific, i.e. lower in males (57,58). This is why we previously recommended an antioxidant nutritional strategy based on sex for newborns during their parenteral nutrition (57). The aim of the study was to demonstrate an impact of neonatal exposure to peroxides contaminating parenteral nutrition on long-term metabolism in animals. This objective was achieved by using only male guinea pigs while satisfying the animal ethic committee in term of the reduction of animals used in research. As mentioned above, it will be of importance to test in a future study the impact of glucose-rich diet on glucose and lipid metabolism in older animals. At this stage, it will be important to include sex as a factor, and seek its impact in human energy metabolism.

In studying the long-term metabolic impact of extreme prematurity, in addition to sex, two main factors could be active: prematurity or low bodyweight at birth and PN or oxidative stress induced by this mode of nutrition. The impact of this prematurity cannot be studied separately from PN. However, it is possible to isolate the effect of PN, as achieved in this study. Thus, our results may not be a true reflection of the situation of an extremely premature infant who receives a PN. However, our results suggest the importance of reducing the oxidative stress induced by PN received by these infants. Our study already proposes to enrich the PN solutions with GSSG as a measure that can partially prevent the long-term impact of early neonatal exposure to PN. It can only be a first step in the neonatal PN improvement practices.

Acknowledgments: We acknowledge the technical work of Thérèse Rouleau and Guillaume Morin, who performed the catheterization and sacrifice of animals, respectively.

Financial support: This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (PJT-148522).

Conflicts of Interest: None.

5. References

1. Raaijmakers A, Jacobs L, Rayyan M, Van Tienoven TP, Ortibus E, Levtschenko E, et al. Catch-up growth in the first two years of life in Extremely Low Birth Weight (ELBW) infants is associated with lower body fat in young adolescence. *PLoS One*. 2017;12(3):28278233.
2. Sipola-Leppänen M, Väärasmäki M, Tikanmäki M, Matinelli HM, Miettola S, Hovi P, et al. Cardiometabolic risk factors in young adults who were born preterm. *Am J Epidemiol*. 2015;181(11):861–73.
3. South AM, Nixon PA, Chappell MC, Diz DI, Russell GB, Jensen ET, et al. Renal function and blood pressure are altered in adolescents born preterm. *Pediatr Nephrol*. 2019 Jan 1;34(1):137–44.
4. Kopec G, Shekhawat PS, Mhanna MJ. Prevalence of diabetes and obesity in association with prematurity and growth restriction. Vol. 10, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 285–95.
5. Breukhoven PE, Kerkhof GF, Willemsen RH, Hokken-Koelega ACS. Fat mass and lipid profile in young adults born preterm. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr;97(4):1294–302.
6. Bassiouny MR, Almarsafawy H, Abdel-Hady H, Nasef N, Hammad TA, Aly H. A randomized controlled trial on parenteral nutrition, oxidative stress, and chronic lung diseases in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Mar;48(3):363–9.
7. Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics*. 1997;99(3).
8. Silvers KM, Darlow BA, Winterbourn CC. Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins. *J Parenter Enter Nutr*. 2001;25(1):14–7.
9. Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Oxygen and parenteral nutrition two main oxidants for extremely preterm infants: “It all adds up.” *J Neonatal Perinatal Med*. 2015;8(3):189–97.

10. Lavoie JC, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J, Chessex P. Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: Role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radic Biol Med*. 2008 Sep 1;45(5):572–7.
11. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn - A 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005;88(3):228–36.
12. Saugstad OD. Room air resuscitation-two decades of neonatal research. In: *Early Human Development*. Elsevier Ireland Ltd; 2005. p. 111–6.
13. Yara S, Levy E, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Total parenteral nutrition induces sustained hypomethylation of DNA in newborn guinea pigs. *Pediatr Res*. 2013;73(5):592–5.
14. Pradhan M, Estève PO, Hang GC, Samaranayke M, Kim G Do, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry*. 2008;47(38):10000–9.
15. Lorente-Pozo S, Parra-Llorca A, Núñez-Ramiro A, Cernada M, Hervás D, Boronat N, et al. The Oxygen Load Supplied during Delivery Room Stabilization of Preterm Infants Modifies the DNA Methylation Profile. *J Pediatr* [Internet]. 2018;202:70-76.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.07.009>
16. Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
17. Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy E, et al. Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res*. 2002;52(6):958–63.
18. Maghdessian R, Côté F, Rouleau T, Ouadda ABD, Levy É, Lavoie JC. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the lipid metabolism in newborn guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(1):278–84.
19. Hyde MJ, Amusquivar E, Laws J, Corson AM, Geering RR, Lean IJ, et al. Effects of lipid-supplemented total parenteral nutrition on fatty liver disease in a premature neonatal piglet model. *Neonatology*. 2008;93(2):77–86.
20. Elremaly W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Adding glutathione to parenteral nutrition

- prevents alveolar loss in newborn Guinea pig. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;87:274–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.040>
21. Morin G, Guiraut C, Perez Marcogliese M, Mohamed I, Lavoie J-C. Glutathione supplementation of parenteral nutrition prevents oxidative stress and sustains protein synthesis in guinea pig model. *Nutrients*. 2019;11(9):2063.
 22. Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, et al. Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol*. 2018;596(23):5535–69.
 23. Elremaly W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Impact of glutathione supplementation of parenteral nutrition on hepatic methionine adenosyltransferase activity. *Redox Biol* [Internet]. 2016;8:18–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.12.003>
 24. McIntyre TM, Curthoys NP. Comparison of the hydrolytic and transfer activities of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem*. 1979;254(14):6499–504.
 25. Turcot V, Rouleau T, Tsopmo A, Germain N, Potvin L, Nuyt AM, et al. Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009;47(3):275–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.026>
 26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–54.
 27. Xu M zhi, Zhang A zhen, Li X rong, Xu W, Shen L wei. Effects of vanadate on the activities of mice glucokinase and hexokinase. *J Zhejiang Univ Sci*. 2004;5(10):1245–8.
 28. Hamer MJ, Dickson AJ. Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment. *Biochem J*. 1987;245(1):35–9.
 29. Karadsheh NS, Uyeda K, Oliver RM. Studies on structure of human erythrocyte phosphofructokinase. *J Biol Chem*. 1977;252(10):3515–24.
 30. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to

- an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry*. 1995. p. 17513–20.
31. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
 32. Blanchard CZ, Waldrop GL. Overexpression and kinetic characterization of the carboxyltransferase component of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1998;273(30):19140–5.
 33. Rao RK, Clayton LW. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(1):610–6.
 34. Kleiber N, Chessex P, Rouleau T, Nuyt AM, Perreault M, Lavoie JC. Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition. *Pediatr Res*. 2010;68(3):188–92.
 35. Tippett PS, Neet KE. Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1983 Apr 1 [cited 2019 Nov 22];222(1):285–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6838225>
 36. Tiedge M, Richter T, Lenzen S. Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch Biochem Biophys*. 2000;375(2):251–60.
 37. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide [Internet]. 1st ed. Vol. 528, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2013. 3–25 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>
 38. Gilbert HF. Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem* [Internet]. 1982 Oct 25 [cited 2019 Nov 22];257(20):12086–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6214556>
 39. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TPM, Sies H. Identification and quantitation of glutathione and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol*. 1983;32(4 M):2529–34.
 40. Knafo L, Chessex P, Rouleau T, Lavoie JC. Association between hydrogen peroxide-

- dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin Chem*. 2005;51(8):1462–71.
41. O'Doherty RM, Lehman DL, Telemaque-Potts S, Newgard CB. Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2020 Feb 28];48(10):2022–7. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.48.10.2022>
 42. Lavoie JC, Chessex P, Rouleau T, Migneault D, Comte B. Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. *Clin Chem*. 2004;50(1):135–40.
 43. Lavoie JC, Chessex P, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J. Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs. *Clin Nutr*. 2007;26(3):341–7.
 44. Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*. 2013;500(7461):222–6.
 45. Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic acid enhances tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc*. 2013;135(28):10396–403.
 46. Nau PN, Van Natta T, Ralphe JC, Teneyck CJ, Bedell KA, Caldarone CA, et al. Metabolic adaptation of the fetal and postnatal ovine heart: regulatory role of hypoxia-inducible factors and nuclear respiratory factor-1. *Pediatr Res* [Internet]. 2002 Aug [cited 2020 Feb 28];52(2):269–78. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-200208000-00021>
 47. Duee PH, Pegorier JP, El Manoubi L. Hepatic triglyceride hydrolysis and development of ketogenesis in rabbits. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1985;12(5).
 48. Bohmer T, Havel RJ. Genesis of fatty liver and hyperlipemia in the fetal guinea pig. *J Lipid Res* [Internet]. 1975 Nov [cited 2020 Feb 28];16(6):454–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1194788>
 49. Bohmer T, Havel RJ, Long JA. Physiological fatty liver and hyperlipemia in the fetal guinea pig: chemical and ultrastructural characterization. *J Lipid Res* [Internet]. 1972 May [cited

2020 Feb 28];13(3):371–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337157>

50. Logothetopoulos J, Ridout JH, Lucas CC. Fatty livers in fetal and newborn rabbits. *Can J Physiol Pharmacol*. 1966;44(1):173–5.
51. Chesta J, Srai SKS, Burroughs AK, Scheuer PJ, Epstein O. Copper overload in the developing guinea pig liver: a histological, histochemical and biochemical study. *Liver*. 1989;9(4):198–204.
52. Du Bois AM. The embryonic liver. In: *The Liver* [Internet]. Elsevier; 1963. p. 1–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483228242500078>
53. Nuyt AM, Lavoie JC, Mohamed I, Paquette K, Luu TM. Adult consequences of extremely preterm birth: cardiovascular and metabolic diseases risk factors, mechanisms, and prevention avenues. *Clin Perinatol*. 2017;44(2):315–32.
54. Helbock HJ, Motchnik PA, Ames BN. Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants. *Pediatrics*. 1993;91(1 I):83–7.
55. Rosa MJ, Lee AG, Wright RJ. Evidence establishing a link between prenatal and early-life stress and asthma development. Vol. 18, *Current opinion in allergy and clinical immunology*. NLM (Medline); 2018. p. 148–58.
56. Metrustry SJ, Karhunen V, Edwards MH, Menni C, Geisendorfer T, Huber A, et al. Metabolomic signatures of low birthweight: Pathways to insulin resistance and oxidative stress. *PLoS One*. 2018;13(3):1–13.
57. Lavoie JC, Tremblay A. Sex-specificity of oxidative stress in newborns leading to a personalized antioxidant nutritive strategy. *Antioxidants*. 2018;7(4):1–11.
58. Lavoie JC, Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(4):648–57.

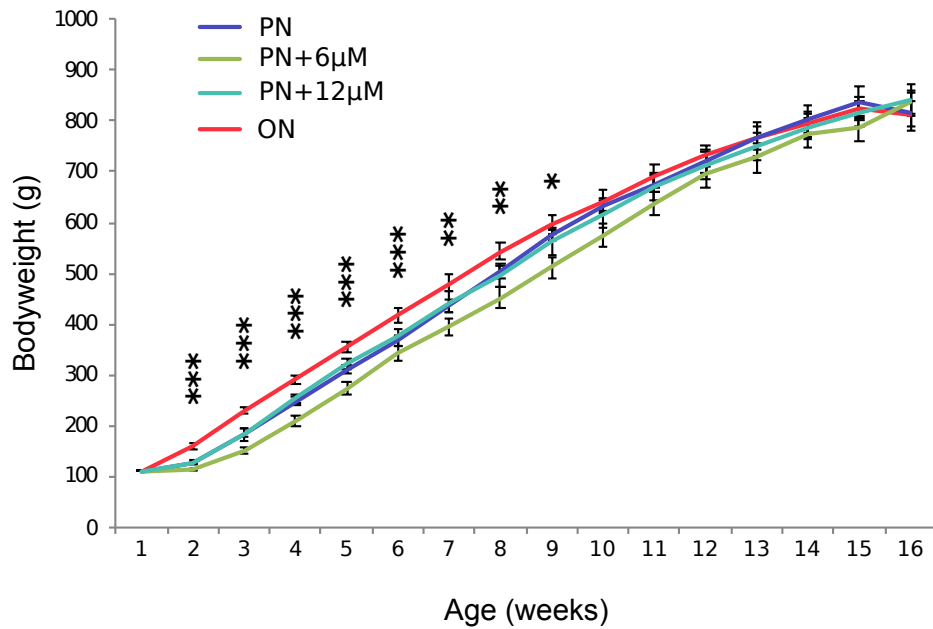


Fig 1: Bodyweight evolution of Hartley Guinea Pigs during 16 weeks of study.

There was no difference between the PN and PN+GSSG groups. From week 2 to week 9, body weight was lighter in the PN groups compared to the ON group. This difference was not significant from the 10th week.

Data are reported as mean \pm S.E.M. per week. PN: parenteral nutrition received during the first week of life (dark blue line); PN+6µM: PN enriched with 6 µM glutathione (green line); PN+12 µM: PN enriched with 12 µM glutathione (light blue line); Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs (red line). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

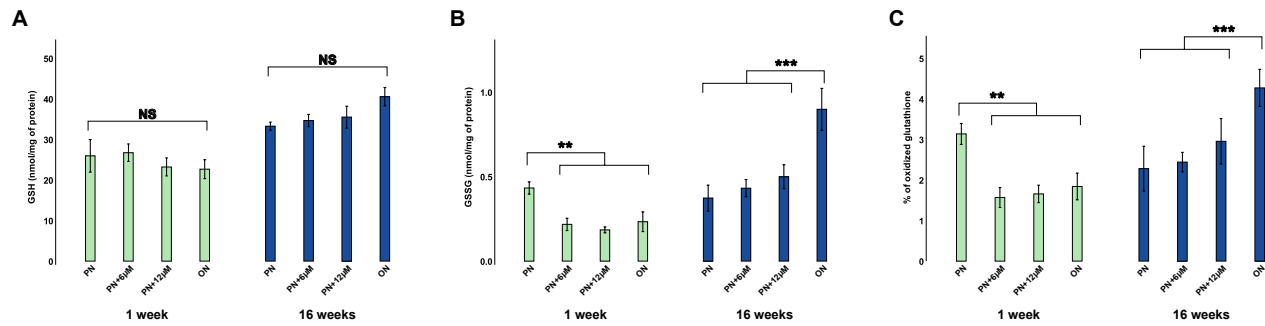


Fig 2: Hepatic levels of GSH, GSSG and proportion of oxidized glutathione measured at 1 and 16 weeks of life of animals.

Panel A: There was no significant interaction between age and modes of nutrition on GSH nor between modes of nutrition. However, GSH was higher ($p < 0.0001$) at 16 weeks (blue bars). Panel B: There was a significant ($p < 0.001$) interaction between age and modes of nutrition on GSSG. At 1 week (green bars), the highest GSSG level was in the PN group ($p < 0.01$) while it was in ON group at 16 weeks ($p < 0.0001$). Panel C: There was a significant ($p < 0.001$) interaction between age and modes of nutrition for proportion of oxidized glutathione. At 1 week (green bars), the highest proportion of oxidized glutathione was in the PN group ($p < 0.01$) while it was in ON group at 16 weeks ($p < 0.001$).

Data are reported as mean \pm S.E.M. PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6μM: PN enriched with 6 μM glutathione; PN+12 μM: PN enriched with 12 μM glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs. Green bars: 1-week animals; Blue bars: 16 weeks animals; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; NS: statistically non-significant.

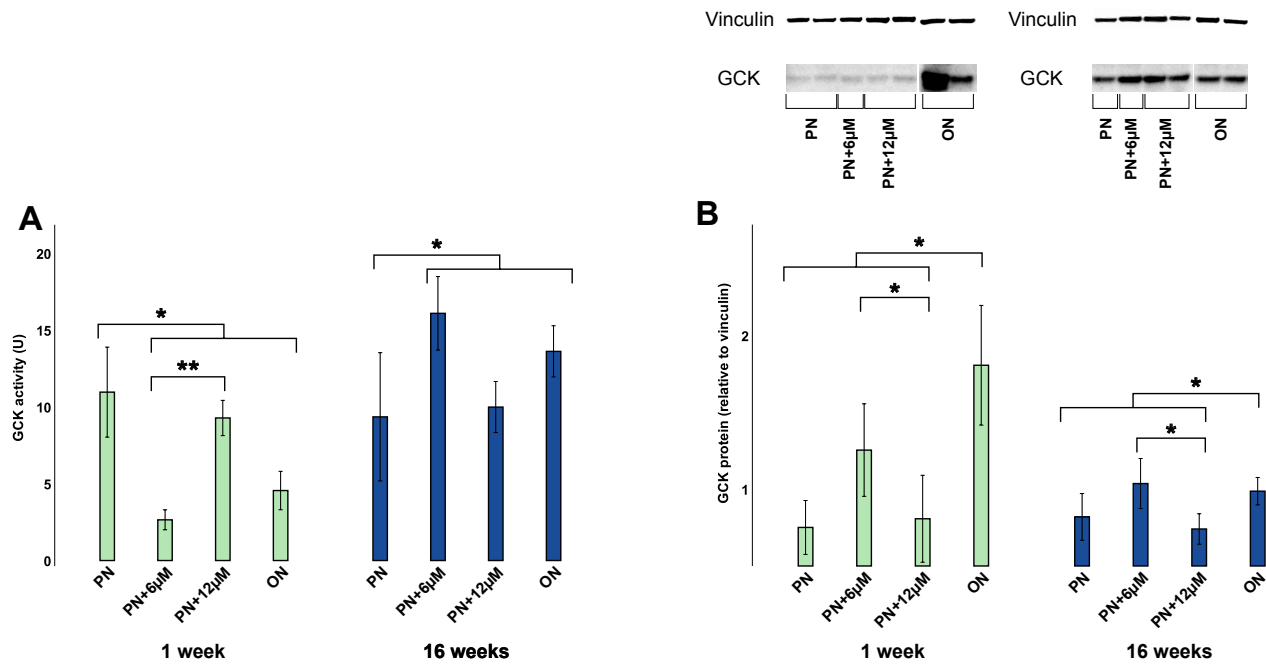


Fig 3: Hepatic activity and protein levels of glucokinase (GCK) measured at 1 and 16 weeks of life of animals.

Panel A: There was a significant ($p < 0.001$) interaction between age and modes of nutrition for GCK activity. At 1 week (green bars), the highest GCK activity was in the PN group ($p < 0.05$) while it was the lowest at 16 weeks ($p < 0.05$). Panel B: There was no significant interaction between age and modes of nutrition for protein levels of GCK. The highest level was in the ON group ($p < 0.01$). The bands from the ON group on the image were cut and transferred to the left of the same image to match the graphic underneath, even though they are part of the same membrane.

Data are reported as mean \pm S.E.M. PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6µM: PN enriched with 6 µM glutathione; PN+12 µM: PN enriched with 12 µM glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs. Green bars: 1-week animals; Blue bars: 16 weeks animals. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

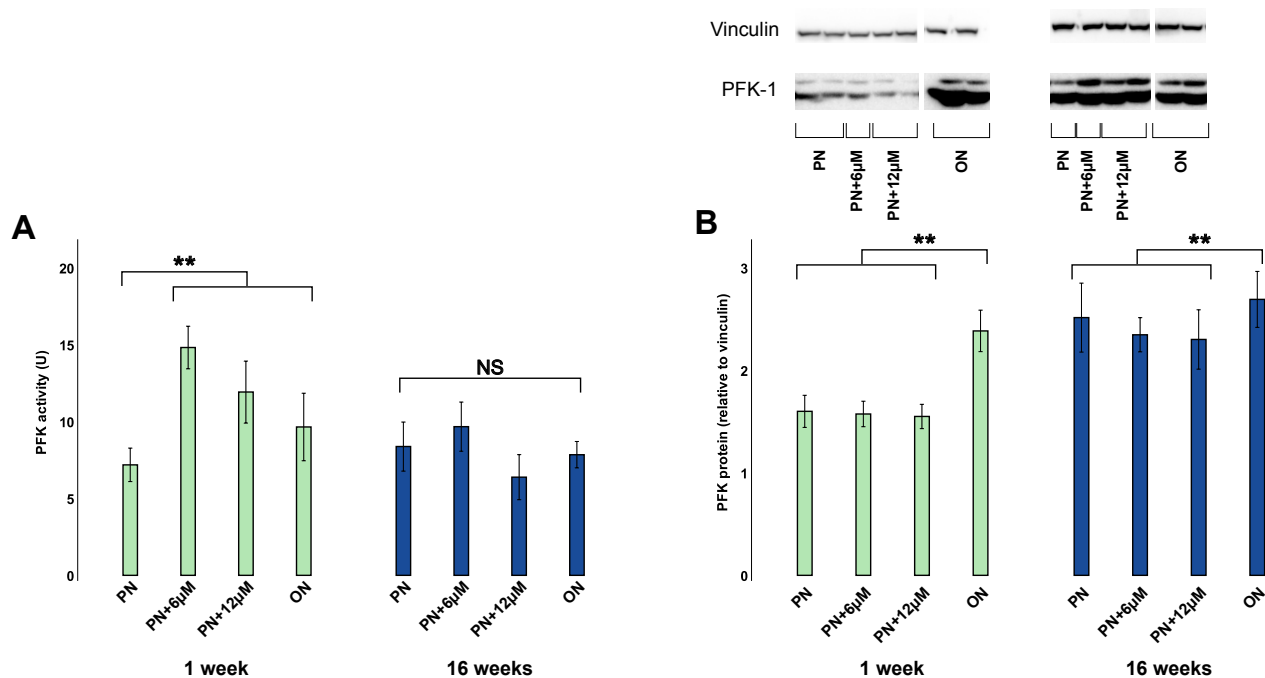


Fig 4: Hepatic activity and protein levels of phosphofructokinase (PFK) measured at 1 and 16 weeks of life of animals.

Panel A: There was a significant interaction between age and modes of nutrition for PFK activity ($p < 0.05$). At one week (green bars), activities were similar between the PN+GSSG groups and the ON group. Their overall value was greater than the measured value of the PN group. Panel B: There was no significant interaction between age and modes of nutrition for protein levels of PFK. The protein level was higher at 16 weeks of age ($p < 0.01$). Among modes of nutrition, the highest level was in the ON group ($p < 0.01$). The bands from the ON group on the image were cut and transferred to the left of the same image to match the graphic underneath, even though they are part of the same membrane.

Data are reported as mean \pm S.E.M. PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6µM: PN enriched with 6 µM glutathione; PN+12 µM: PN enriched with 12 µM glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs. Green bars: 1-week animals; Blue bars: 16 weeks animals. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; NS: statistically non-significant.

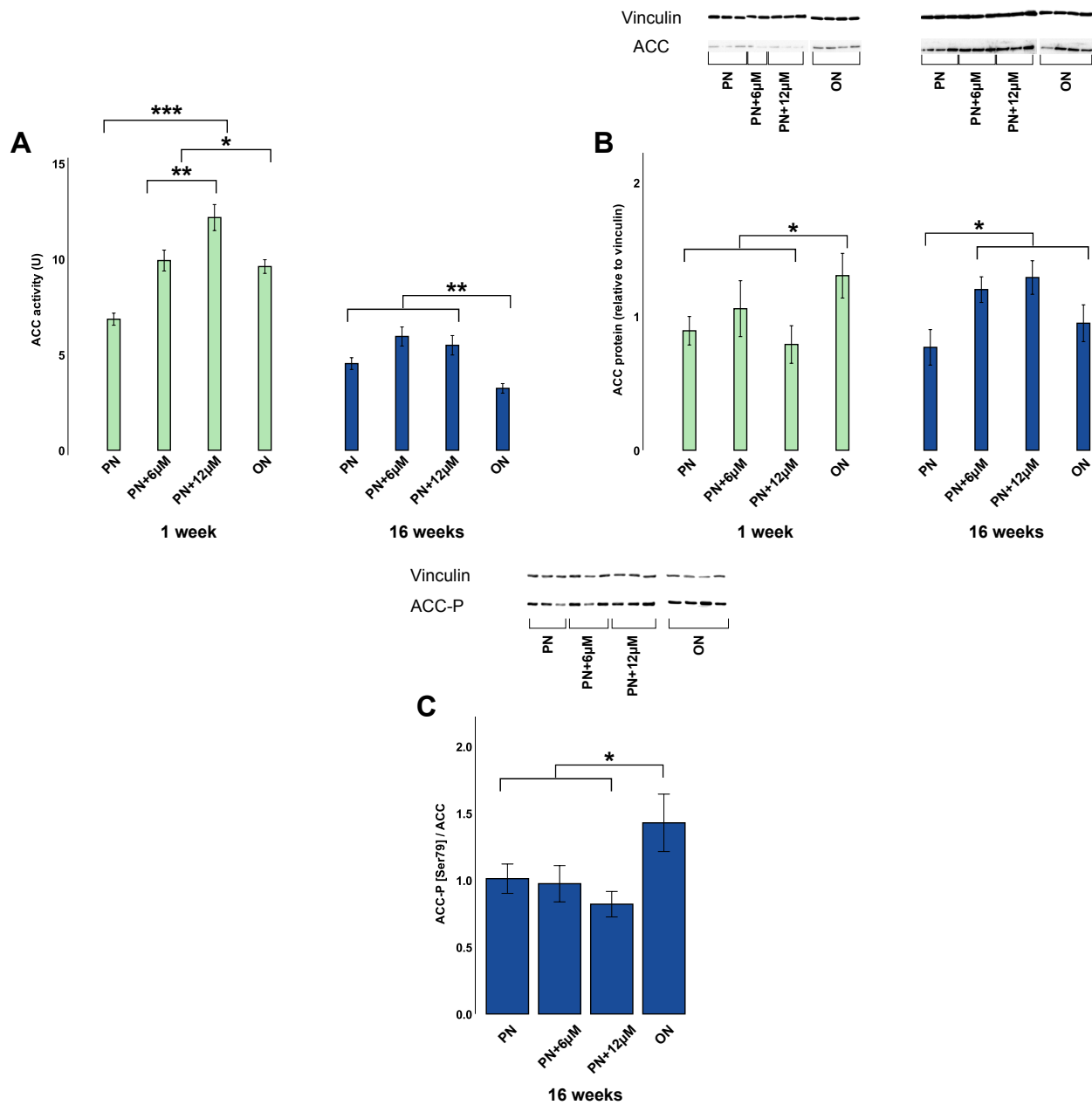


Fig 5: Hepatic activity and protein levels of acetyl-CoA-carboxylase (ACC) measured at 1 and 16 weeks of life of animals and phosphorylation of ACC in Ser79 measured at 16 weeks of life of animals.

Panel A: There was a significant ($p < 0.001$) interaction between age and modes of nutrition for ACC activity. At 1 week, the lowest activity was in the PN group ($p < 0.001$). At 16 weeks, the ACC activity was the lowest in the ON group ($p < 0.01$). Panel B: There was a significant ($p < 0.05$)

interaction between age and modes of nutrition for protein levels of ACC. At 1 week, the highest level of protein was in the ON group ($p < 0.05$). At 16 weeks, the ACC protein level was the lowest in the PN group ($p < 0.01$). The bands from the ON group on the image were cut and transferred to the left of the same image to match the graphic underneath, even though they are part of the same membrane. This was done for the graphics in panel C. Panel C: The ratio of phosphorylated ACC on total ACC protein was the highest in the ON group ($p < 0.05$).

Data are reported as mean \pm S.E.M. PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6 μ M: PN enriched with 6 μ M glutathione; PN+12 μ M: PN enriched with 12 μ M glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs. Green bars: 1-week animals; Blue bars: 16 weeks animals; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

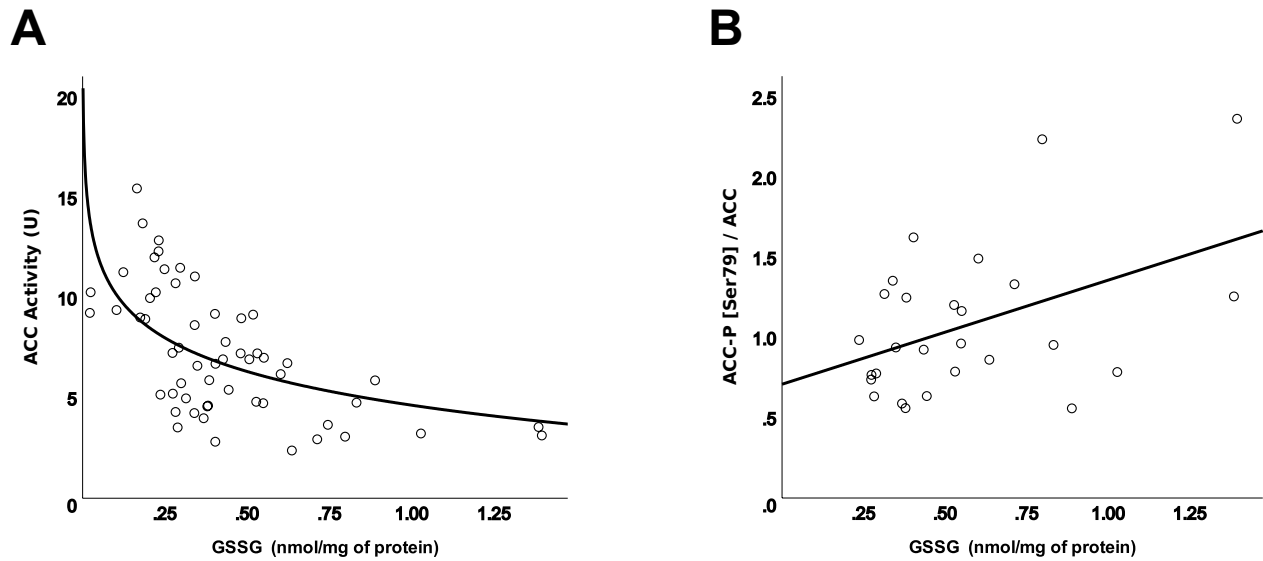


Fig 6: Linear relationship between ACC activity and phosphorylation of ACC in Ser79 with GSSG level.

Panel A: The negative relationships between ACC activity and hepatic GSSG, including all data collected at 1 and 16 weeks, was significant ($y = -2.41 \cdot \ln(\text{GSSG nmol} \cdot \text{mg of protein}^{-1}) + 4.64$; $r^2 = 0.33$; $p < 0.001$). Panel B: The positive relationships between the ratio ACC-P[Ser79]/ACC and hepatic GSSG was significant $y = 0.65 \cdot (\text{GSSG nmol} \cdot \text{mg of protein}^{-1}) + 0.71$; $r^2 = 0.20$, $p < 0.05$).

ACC: Acetyl-CoA Carboxylase-1; GSSG: disulfide form of glutathione. U: $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$.

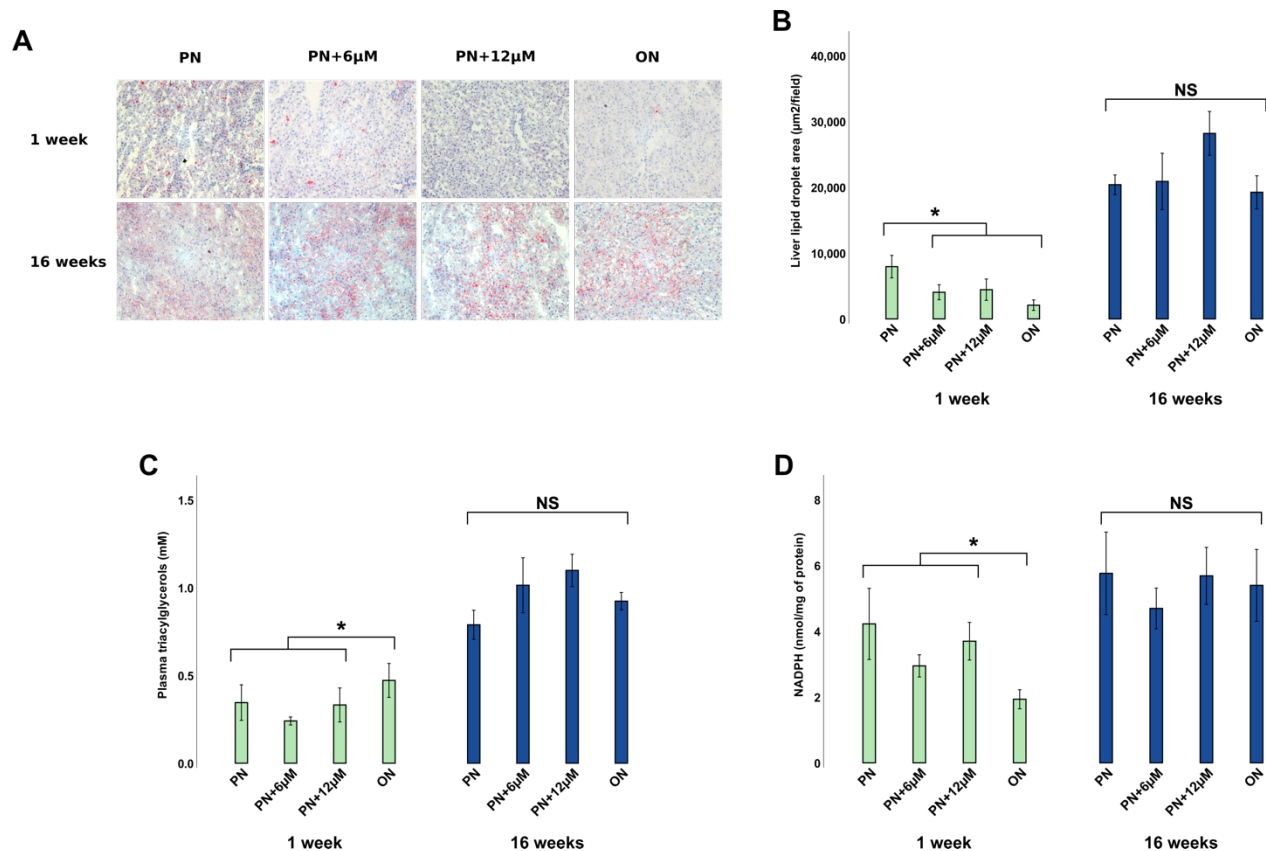


Fig 7: Liver lipids, plasma triacylglycerol and liver NADPH concentrations measured at 1 and 16 weeks of life of animals.

Panel A: Representative images of Oil Red (lipid droplets) and Hematoxylin (nuclei) staining by group. Panel B: At 1 week, the surface area of lipid droplets was larger ($p < 0.05$) in the PN group compared to the PN+GSSG groups and the ON group, which had a similar value. There was no difference between the groups at 16 weeks. Panel C: At 1 week, plasma concentration of triacylglycerol was lower ($p < 0.05$) in the PN groups compared to the ON group. At 16 weeks, there was no difference. Panel D: Liver NADPH levels were increased ($p < 0.05$) in the PN group at 1 week of life. No differences were found at 16 weeks.

Data are reported as mean \pm S.E.M. PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6 μ M: PN enriched with 6 μ M glutathione; PN+12 μ M: PN enriched with 12 μ M glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs. Green bars: 1-week animals; Blue bars: 16 weeks animals; *: $p < 0.05$; NS: statistically non-significant.

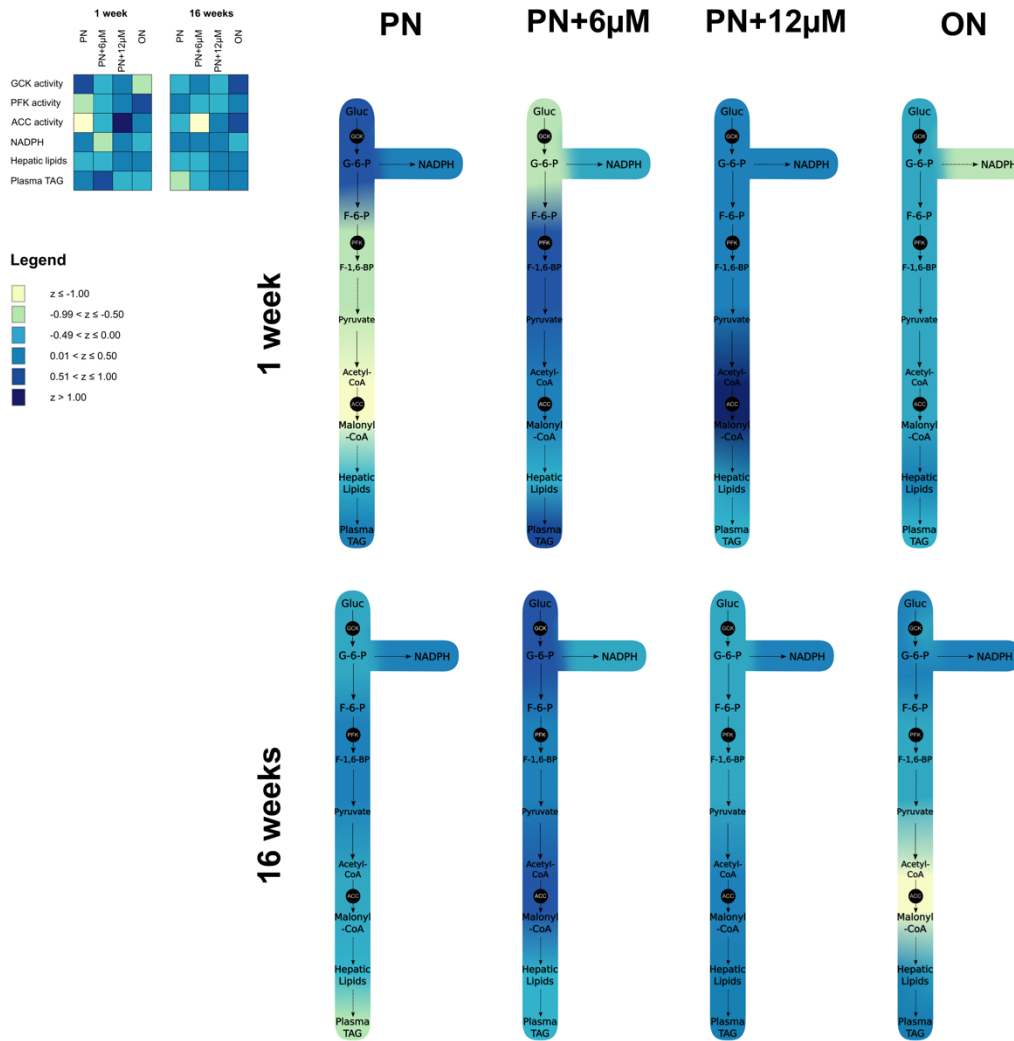


Fig 8: Metabolic flow of glucose in animals of 1 and 16 weeks.

Values were transformed into Z-scores, and their means were color-coded according to defined intervals (see method section). These colors were then used to illustrate the metabolic changes in a simplified metabolic pathway of glucose in liver.

PN: parenteral nutrition received during the first week of life; PN+6µM: PN enriched with 6 µM glutathione; PN+12 µM: PN enriched with 12 µM glutathione; Oral Nutrition (ON): animals fed with regular food for guinea pigs.

Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 1

GSH et GSSG aux poumons

Méthode

Les mêmes [méthodes](#) décrites dans l'article ont été utilisés.

Résultats

Les résultats de GSH et GSSG à 1 semaine de vie aux poumons sont publiés, mais ne font pas partie de cette thèse (273). Les résultats des animaux de 16 semaines sont présentés ici.

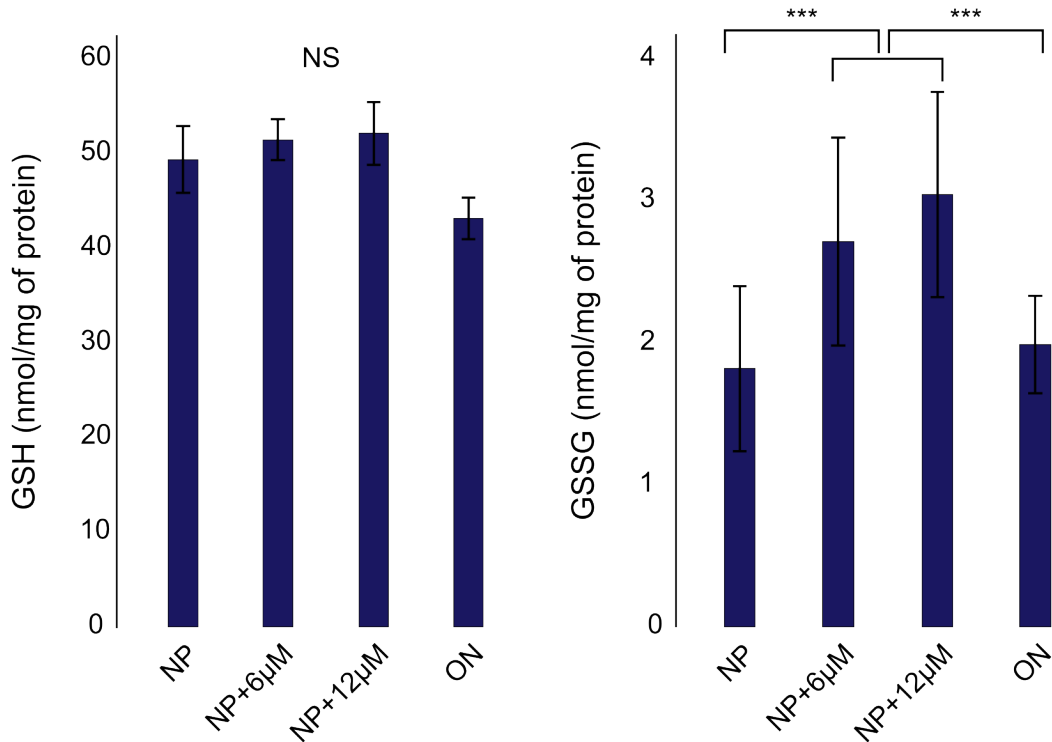


Figure 11 GSH et GSSG aux poumons des animaux nourris par nutrition parentérale ajouté ou non en GSSG, à 16 semaines de vie

NS : non-significatif; *** : $p < 0.001$

Aucune différence significative au niveau du GSH pulmonaire à 16 semaines n'a été trouvée. Les niveaux de GSSG étaient plus élevés chez les animaux ayant reçu la nutrition parentérale ajouté en

GSSG que les niveaux du groupe ayant reçu la nutrition orale ($F_{(1,24)}=21.1$; $p<0.001$), ou la nutrition parentérale sans glutathion ($F_{(1,24)}=14.9$; $p<0.001$) en âge néonatale.

Conclusions générales de l'objectif 1

La première étude de cette série démontre que les différents paramètres métaboliques au foie sont affectés par des différents facteurs de la nutrition parentérale. Notamment :

- 1) les peroxydes de la NP semblent être responsables par l'augmentation des niveaux de GSSG et d'activité de la glucokinase, ainsi que de la diminution des activités de la PFK-1 et de l'ACC à 1 semaine de vie au foie. À 16 semaines de vie, les peroxydes sont responsables de la baisse de l'activité de la glucokinase. Ces perturbations sont prévenues par l'ajout de glutathion à la NP;
- 2) la diminution des niveaux protéiques de la glucokinase, de la PFK-1 et de l'ACC à 1 semaine de vie au foie ne peut pas être expliquée par les peroxydes de la NP. De même, l'élévation de l'activité de l'ACC à la seizième semaine et la baisse des taux protéiques de la glucokinase et de la PFK-1 ne peuvent pas être imputées à aux peroxydes de la NP;
- 3) Bien que les résultats de l'effet de la nutrition parentérale sur le métabolisme redox à 1 semaine de vie aux poumons soient présentés dans un autre étude (273), les résultats à long terme démontrent que la NP n'affecte pas les niveaux de GSH ni de GSSG. Cependant, l'ajout de glutathion semble augmenter le GSSG pulmonaire en âge adulte.

Par suite des résultats qui ne peuvent pas être expliqués par la présence de peroxydes de la NP (conclusion #2) et en retenant à l'esprit l'objectif général de caractériser l'impact des autres facteurs de la NP, la suite logique de ces résultats était de tester l'effet des déficiences en vitamine C et en cystéine sur les mêmes variables hépatiques mesurés lors de l'exécution de l'objectif 1.

**Réponse à l'objectif 2 - Neonatal Vitamin C and Cysteine Deficiencies Program Adult
Hepatic Glutathione and Specific Activities of Glucokinase, Phosphofructokinase, and
Acetyl-CoA Carboxylase in Guinea Pigs' Livers**

Neonatal Vitamin C and Cysteine Deficiencies Program Adult Hepatic Glutathione and Specific Activities of Glucokinase, Phosphofructokinase, and Acetyl-CoA Carboxylase in Guinea Pigs' Livers

Published on [Antioxidants](#).

Vitor Teixeira¹, Ibrahim Mohamed² and Jean-Claude Lavoie^{1,2*}

¹Department of Nutrition, University of Montreal, and CHU-Sainte-Justine Research Centre, 3175 Cheminde la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

²Department of Pediatrics-Neonatology, CHU Sainte-Justine, University of Montreal, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada.

Contribution

- Teixeira V (70%) : conceptualisation, methodology, investigation, formal analysis, writing of original draft.
- Mohamed I (10%) : funding acquisition, reviewing and editing of manuscript.
- Lavoie JC (20%) : conceptualisation, investigation, project administration, formal analysis, reviewing and editing of manuscript, funding acquisition.

*Corresponding author :

Received: 14 May 2021

Jean-Claude Lavoie, PhD,

Accepted: 9 June 2021

Research Centre, CHU Sainte-Justine,

Published: 12 June 2021

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine,

Montreal, QC, H3T 1C5, Canada.

Email: jean-claude.lavoie@umontreal.ca

Abstract

Premature neonates are submitted to an early-life oxidative stress from parenteral nutrition, which is vitamin C (VC) deficient, and induces low endogenous levels of glutathione. The oxidative stress caused by these deficiencies may permanently affect liver glycolysis and lipogenesis. This study evaluates the short- and long-term effects of neonatal VC and cysteine deficient diets on redox and energy metabolism. Three-day-old Hartley guinea pigs from both sexes were given a regular or a deficient diet (VC, cysteine, or both) until week 1 of life. Half of the animals were sacrificed at this age, while the other half ate a complete diet until 12 weeks. Liver glutathione, and the activity and protein levels of glucokinase, phosphofructokinase and acetyl-CoA-carboxylase were measured. Statistics: factorial ANOVA (5% threshold). At 1 week, all deficient diets decreased glutathione and the protein levels of glucokinase and phosphofructokinase, while cysteine deficiency decreased acetyl-CoA-carboxylase levels. A similar enzyme level is observed in control animals at 12 weeks. At this age, VC deficiency decreased glutathione, while cysteine increased it. Acetyl-CoA-carboxylase protein levels were increased, which decreased its specific activity. Early-life VC and cysteine deficiencies induce neonatal oxidative stress and an adult-like metabolism, while predisposing to increased lipogenic rates during adulthood.

Keywords: glutathione; oxidative stress; vitamin C; cysteine; energy metabolism; metabolic re-programming; DOHaD; guinea pig; neonate; non-alcoholic fatty liver disease.

1. Introduction

Right after birth, oxygen concentrations rise sharply from 20-25 mm Hg to 100 mm Hg, allowing mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation, with a consequent increase in generation of reactive oxygen species (ROS)[1–4]. This oxidative stress early in life is necessary to trigger the transition from fetal metabolism to neonatal and eventually adult metabolism. However, this oxidative stress can be exacerbated by medical interventions at early age, such as supplemental oxygen and parenteral nutrition (PN) that is given to premature infants [5]. This exacerbated early-life oxidative stress has been shown to contribute to the development of several neonatal comorbidities [5–7], but also to program health and disease later in life. Premature newborns develop, at adulthood, higher risk of cardiovascular disease and hypertension [8–10], non-alcoholic fatty liver disease [11] and obesity [12].

Neonatal PN is a mode of nutrition administered to premature newborns who have not yet completed gastrointestinal maturity. This PN, although essential for survival of the extremely preterm newborn, is contaminated with peroxides autogenerated in solution. When photoexcited, dissolved riboflavin catalyzes the electron transfer from reducing molecules to dissolved oxygen, in a reaction where the former become oxidized, and oxygen is reduced to hydrogen peroxide. Among the reducing molecules oxidized in this reaction, vitamin C is the main contributor, given its antioxidant properties, tendency to lose electrons and its high concentration in PN solutions [13,14]. Because of this reaction, vitamin C in PN is completely depleted after a few hours [13]. This inadequate infusion is responsible for a decrease of 50% of liver vitamin C concentrations, as shown in an animal model [15]. Simultaneously, peroxides rise to 350 μ M in PN solutions and can reach 1500 μ M with increasing concentrations of vitamins [14]. These peroxides in PN deplete tissue glutathione and generate oxidative stress [16].

We have previously showed that guinea pigs submitted to PN during the first days of life develop glucose intolerance, are less physically active [17], and have altered levels of key energy metabolism enzymes in liver at adult life [16]. On this same model of PN induced oxidative stress, most of early life impacts of PN are due to peroxides, but many long-term effects of PN remain after the effect of early peroxides is prevented. This suggested that other factors in PN, other than peroxides were the cause of those effects [16]. Vitamin C deficiency in PN solutions and lower glutathione levels are suspected. For instance, early-life PN induces in adulthood lower levels of

glycolytic enzymes glucokinase (GCK) and phosphofructokinase-1 (PFK) in liver, while increasing the levels of acetyl-CoA-carboxylase (ACC), the enzyme that controls de novo lipogenesis [16]. Given these enzymes control major metabolic pathways that are associated with the development of metabolic diseases, correcting vitamin C and glutathione deficiencies could be a key strategy to decrease the long-term impact of early-life PN.

Ascorbate, or vitamin C, is an essential nutrient for primates and guinea pigs [18], and it is implicated in several redox reactions as a direct antioxidant. It can act as a direct redox cofactor, by recycling oxidized vitamin E and proteins [19], while also participating in epigenetic modulation by its role in the demethylation of DNA and histones [20,21], and oxygen sensing, by promoting HIF-1 α degradation [22]. Meanwhile, reduced glutathione (GSH) is the most abundant intracellular antioxidant with a high antioxidant capacity ($E^{\circ}_{\text{GSH/GSSG}} = -240 \text{ mV}$), and it is implicated in antioxidant enzymatic reactions such as the ones of glutathione peroxidase and glutaredoxin [23–25] and its deficiency can activate inflammation and antioxidant pathways via NF- κ B and Nrf2 [26,27]. GSH synthesis is controlled by cysteine concentrations, the cellular availability of which is recognized as being limiting for GSH synthesis. [28].

GSH and ascorbate spare each other, mainly because GSH can recycle dehydroascorbate back to ascorbate [29,30]. Despite their interconnection, their specific deficiency is expected to have different effects. Thus, this study aims to determine the short- and long-term effects of neonatal vitamin C and glutathione deficiencies on hepatic energy metabolism. These deficiencies were induced by a diet without ascorbate or without cysteine and low in methionine during the first week of the guinea pig's life. They could exacerbate the physiological oxidative stress necessary for metabolic transition and accelerate it. We hypothesize that an exacerbated oxidative stress, caused by one of these deficiencies, triggers an accelerated metabolic transition in liver, programming an adult metabolism phenotype at neonatal age in liver, and increasing the risk for metabolic syndrome at adult age. In this study we induced these deficiencies by complete exclusion of vitamin C or cysteine from neonatal diet. Cysteine, as the glutathione limiting substrate, is removed from the diet to induce glutathione deficiency.

2. Materials and Methods

Materials

All chemical products were purchased from Sigma-Aldrich, Fischer Scientific, Roche Diagnostics, Bio-Rad laboratories, or MP Biomedicals, unless otherwise stated.

Animal model

Three-day old male and female Hartley guinea pigs from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) were assigned to one of the following groups, each one containing 16 animals (8 males and 8 females) to receive a diet: 1) Control (C); 2) Vitamin C Deficient (VCD); 3) Cysteine Deficient (CD); 4) Double Deficient (DD). After 4 days receiving these diets, from day 3 to 7 days (1 week) of life, half of the animals in each group were sacrificed, and the other half had their diets changed to a long-term standard diet (2041-Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet; Envigo, Madison, WI, USA), which contains adequate amounts of vitamin C and cysteine.

Cysteine deficient diets also had lower levels of methionine, to reduce in vivo transformation of methionine into cysteine, while still providing adequate amounts of methionine for physiological functions [31]. To provide isoproteic diets, the amino acid content of the cysteine devoid diets was balanced with non-essential amino acids for guinea pigs (Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Pro and Ser). The composition of these diets is described in table 1. All custom diets were produced by Envigo. Animals were housed in standard conditions in a 12/12 hrs light/dark cycle throughout the study.

Food Intake was measured at 1 week, and 4, 8 and 12 weeks by the weight difference of feeders placed in cages after 24h. Since two animals from the same group and sex shared the same cage, the food intake is reported by cage, and not by animal in order to avoid distortions in variability.

Spontaneous physical activity was measured at week 5 by placing animals individually in a cage crossed by infrared beams (Digiscan DMicro Monitor; Accuscan Instruments, Inc., Columbus, OH), as described previously (17). Each time the animal crosses one of the beams, one beam cut is counted. Counts were registered during 20 min, after 40 min of acclimation.

Glutathione, ascorbate and dehydroascorbate (DHA). Two hundred fifty mg of freshly collected liver were homogenized in 5 volumes of 5% (w/v) metaphosphoric acid and centrifuged at 7200 g/3 min; the supernatant and the pellet were stored at -80°C. The reduced (GSH) and oxidized form (GSSG) of glutathione as well as ascorbate and dehydroascorbate in supernatants were separated in an Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) in a boric acid 200 mM and acetonitrile 20% v/v buffer, pH 9.6 [32]. Samples were diluted to reach 1% meta-phosphoric acid concentration, and species were separated in buffer for 10min

after 8 sec sample injection under 30 kV. GSH and GSSG were quantified by absorbance at 192 nm, whereas ascorbate was quantified by absorbance at 268 nm. Samples were treated with DTT 50 mM in order to detect DHA by its reduction to ascorbate. The increase in the ascorbate peak was calculated and DHA levels were extrapolated through the ascorbate standard curve. Total proteins were measured in pellets by the Bradford method using albumin for the standard curve, as previously described [33]. Data are expressed in nmol/mg protein. The redox potential of glutathione was obtained according to the Nernst equation using the molar concentrations of GSH and GSSG, assuming a liver density of one.

Glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) assay. Twenty milligrams of liver were homogenized in 9 volumes of TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA-Na₂) and centrifuged at 7 200 g/1 min. The supernatant was diluted in TE buffer (1:10) and 12.5 µg of protein was used to assay each enzyme. GPx activity was measured in an assay containing 2mM GSH, 1mM tert-butyl-hydroperoxide, 0.1 mM NADPH, and 0.1 U/mL of GSSG-reductase diluted in TE buffer. The reaction was started by the addition of the sample. NADPH consumption was measured by its spectrophotometric absorbance at 340 nm for 6 minutes. GR activity was measured in TE buffer containing 1mM GSSG and 0.1 mM NADPH. The reaction was started by the addition of the sample, and the consumption of NADPH was measured at 340 nm. NADPH concentrations for both assays were extrapolated from a slope calculated with increasing NADPH quantities, ranging from 0 to 1 mmol.

Glucokinase (GCK) activity was assayed as described previously (16). Briefly, liver was homogenized in 2 volumes of buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA-Na₂, 5 mM MgCl₂, 150 mM KCl and 50µM 2-mercaptoethanol) and centrifuged at 1400 g/20 min/4°C. Glucokinase activity was determined by increasing the absorbance at 340 nm in a reaction containing 0.5 mM ATP, 0.4 mM NADP, 0.067 U/mL G6PDH, and 0.5 mM or 100 mM of glucose added to the buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂) for 1 h/30°C. Glucokinase activity was calculated by the subtraction of the activity measured with 0.5 mM glucose (hexokinase), from the one measured at 100 mM (hexokinase + glucokinase). Data are presented as U (nmol of NADPH •min⁻¹•mg of protein⁻¹).

Phosphofructokinase (PFK) activity was assayed as described previously [16]. Briefly, the activity was measured by the change in absorbance at 340 nm in a reaction system coupled with aldolase,

triose phosphate isomerase and GAPDH. Data are presented as U (nmol of NADPH •min⁻¹•mg of protein⁻¹).

Acetyl-CoA-carboxylase (ACC) activity was assayed as described previously [16]. Briefly, it was extracted from livers with increasing concentrations of polyethylene-glycol-8000 in an extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM mannitol, 50 mM NaF, 5 mM Na₂P₂O₇, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 4 µg/mL soybean trypsin inhibitor and 1 mM benzamidine). This technique is the same described by Kudo [34], but reducing agents were removed to allow observation of possible changes in activity protein oxidation. The extracted ACC was assayed in a buffer containing 60 mM Tris-Acetate pH 7.5, 1 mg/mL BSA, 2 mM ATP, 1 mM acetyl-CoA, 5 mM Mg(CH₃COO)₂ for 20 min/37°C. The reaction was started by the addition of 1.64 mM NaH[¹⁴C]O₃ (1.35 µCi of 5 mCi/mmol) and 16.6 mM of NaHCO₃. The incorporation of ¹⁴C into malonyl-CoA was measured by scintigraphy. Data are presented as U (nmol of NADPH •min⁻¹•mg of protein⁻¹).

Western Blots of GCK, PFK and ACC. Western blot methods were described previously [16,35,36]. Primary antibodies were the following: GCK (rabbit GCK polyclonal antibody ab88056, Abcam Plc, ON, Canada), PFK (mouse PFK-1 monoclonal antibody sc-166722, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ACC (rabbit ACC-1 polyclonal antibody #3662, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) at 1:1000 dilution. Vinculin was used as a loading control (mouse VCL monoclonal antibody H00007414-M01, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). Secondary antibodies were: goat anti-mouse IgG-HRP antibody HAF007 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and goat anti-rabbit IgG-HRP antibody W4011 (Promega, Madison, WI, USA) at 1:2500 dilution.

Western Blots of Nrf2; HIF-1α; NF-κB. Liver samples (100 mg) were homogenized in 1mL of buffer of 320 mM sucrose, 4 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 200 µM deferoxamine, 10 µg/mL PMSF and Complete Protease Inhibitor (1 tablet/25mL) (Roche Applied Science). Samples were centrifuged 600 g/10 min/room temperature, which allows the separation of the pelleted nuclei and the cytosolic supernatant. Cytosolic supernatants were concentrated in a 10 kDa Amicon ultra 0.5 centrifugal filter unit and then diluted in 250 µL of storage buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.01 mg/mL aprotinin, 0.005 mg/mL leupeptin, 4 mM NaVO₃ and 0.4 mM PMSF) and stored at -80°C. The pelleted nuclei were washed in 300 µL of

PBS added with 200 μ M deferoxamine and 10 μ g/mL PMSF and pelleted again (600 g/10 min/room temperature). The pellet was resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.6, 50 mM NaCl, 1% w/v sodium deoxycholate, 0.01% v/v Triton X-100, 0.01% w/v SDS, 13 mM Na_3VO_4 and 200 μ M deferoxamine) and agitated for 1 h/4°C. The nuclear fraction was then aliquoted and stored at -80°C. Fifty micrograms of cytosolic and nuclear extracts were resolved by SDS-PAGE in 4/8% gels, 120 V/2 h/room temperature in a 25 mM Tris, pH 8.3, 200 mM glycine and 1% SDS. Proteins were transferred to a PVDF membrane 90 V/2h/4°C in 5 mM Tris, 38 mM glycine. Membranes were blocked in 5% w/v skim milk in PBS-Tween20 0.2% for 1 h/room temperature. Primary antibodies used were the following: anti-Nrf2 antibody (rabbit Nrf2 monoclonal antibody ab62352, Abcam Plc, ON, Canada) (1:1000), anti-NF- κ B (mouse p50 monoclonal antibody sc-8414, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:1000), and anti-HIF-1 α antibody (rabbit HIF-1 α polyclonal antibody ab2185, Abcam Plc) (1:2000). Histone deacetylase 1 was used as a loading control for nuclear extracts (rabbit HDAC1 monoclonal antibody, ab150399, Abcam Plc.) (1:1000). Despite HDAC1 levels have been shown to be affected by ascorbate levels [37] in cancer cells, we found no correlation of liver ascorbate levels in our samples ($\text{HDAC1 levels} = (-0.1039 \cdot \text{ascorbate}) + 10.708$; $r^2 = 0.0038$), which made HDAC1 a suitable nuclear control protein. Vinculin (cytoplasmic loading control protein) antibody and secondary antibodies were the same used for GCK, PFK and ACC.

Statistics. Data are presented as mean \pm S.E.M. ANOVAs were performed using two different models of comparison. To test the effect of each deficiency at 1 or 12 weeks of life, a three-way-ANOVA was performed using vitamin C, cysteine, and sex as independent factors. To test the developmental change, a one-way ANOVA was performed. All variables in each group at 1 week was compared to the same group at 12 weeks, to test the effect of age within each group. The significance threshold was set at 5%.

3. Results

3.1. Diet type and phenotypical changes

Basal characteristics are described on table 2. The bodyweight was lower in all deficient groups at one week of life, however, only animals in cysteine deficient groups experienced a weight loss. Animals in VCD group gained weight comparable to the control group. Liver weight was not affected at 1 week of age. At 12 weeks of age, the percentage of bodyweight attributed to the liver

weight was lower in cysteine deficient animals. Sex was an important factor at 12 weeks, as females had significantly lower bodyweight ($F_{\text{Sex}(1,24)}= 58.73$, $p<0.001$; F: 521 ± 11 g vs. M: 641 ± 12 g) and liver weight ($F_{\text{Sex}(1,24)}= 20.35$, $p<0.001$; F: 20 ± 0.8 g vs. M: 16 ± 0.6 g), but this difference was not present when liver weight was normalized by bodyweight, meaning the difference is due to bodyweight differences.

At 1 week of life, the food intake was lower in cysteine deficiency groups ($F_{\text{Cysteine}(1,23)}=40.3$; $p<0.001$)(CD and DD) than in C and VCD groups. In function of age, food intake in control and DD groups fitted in a linear model ($r^2_{\text{C}}=0.76$, $p<0.01$; $r^2_{\text{DD}}=0.65$, $p<0.01$), while VCD and CD groups fitted in a quadratic model ($r^2_{\text{VCD}}=0.45$, $p<0.05$; $r^2_{\text{CD}}=0.41$, $p<0.05$), meaning progression curves are different among groups (Figure 1A). Thus at 12 weeks of age, food intake was 40% lower in animals having received a deficient diet neonatally (VCD, CD, DD: 31 ± 1.9 vs. C: 51 ± 4.4 g/d; ($F_{(1,12)} = 118.65$, $p<0.001$).

Cysteine deficiency groups were associated with lower level of spontaneous physical activity at 1 month of age (Figure 1B).

3.2. Ascorbate and dehydroascorbate (DHA)

At 1 week of age, liver ascorbate was lower in vitamin C deficiency groups (Figure 2A). At 12 weeks of age, the significant interaction between early-life vitamin C and cysteine deficiencies led to further analyses. Hepatic ascorbate level was higher in the CD group ($F_{(1,28)} = 6.22$, $p < 0.05$). This increase was not observed in animals that received the DD during their first week of life (Figure 2A). Animal sex was not a significant variable in liver ascorbate or DHA levels. DHA was not affected by any of the deficiencies, neither at 1 week nor at 12 weeks of life (Figure 2B). The mean ratio of DHA on AA was $8.9 \pm 0.8\%$. Similar ratios (5-25% DHA/total ascorbate), determined by high-performance liquid chromatography, have already been reported in guinea pigs' livers [38,39]. It has been suggested that guinea pigs have a higher recycling capacity of DHA, as they cannot generate ascorbate from glucose like rats and mice. Changes in hepatic ascorbate were not sufficient to influence the levels of HIF-1 α (the degradation of which is dependent on ascorbate level) neither in neonatal nor in adulthood (Figures 2C and 2D).

3.3. Glutathione and oxidative stress

At 1 week of life, compared to the control group, GSH level was decreased by both VCD and CD. However, their significant interaction suggested that their effects reached a plateau because the value observed in the DD group was not further decreased (Figure 3A). A similar impact of deficiencies on redox potential of glutathione was observed; both deficiencies led to a plateau with a mean value of -202 ± 2 mV, more oxidized than control -218 ± 3 mV (Figure 3C). Since deficiencies had no impact on GSSG levels (Figure 3B), changes in the redox potential of glutathione appear to be caused by lower levels of GSH. There was no statistically significant difference between groups for nuclear Nrf2 (Figure 3D). However, an interaction between vitamin C and cysteine deficiencies was observed for the cytoplasmic levels of Nrf2 (the stimulation of which favors the synthesis of GSH), blunting the effect of vitamin C and cysteine deficiencies (Figure 3E), much like the effect observed in GSH levels and redox potential. Changes in glutathione were not associated with modification in NF- κ B levels, which is normally activated by oxidative stress (Figures 3F and 3G). The animal sex had no significant impact on glutathione, NF- κ B or Nrf2 levels.

At 12 weeks of life, early-life vitamin C deficiency decreased GSH levels, oxidized redox potential, and decreased nuclear levels of Nrf2 (Figures 3A, C, E). Early-life cysteine deficiency increased both GSH and GSSG levels (Figures 3A and 3B). Vitamin C and cysteine deficiencies both increase NF- κ B cytoplasmic levels, but the addition of their deficiencies in DD group blunts the statistical effect (Figure 3G). GSSG levels, redox potential of glutathione and nuclear NF- κ B levels were higher in female animals, independently of diets (GSSG: +56%; redox potential: 3.6 mV; Nuclear NF- κ B: 46%), whereas cytoplasmic Nrf2 was lower in females, compared to males (-18%).

3.4. Glutathione Peroxidase and Reductase

At 1 week of life, vitamin C deficiency increased the activity of GPx by 11% while no difference between groups was observed in the activity of GR (Figures 4A and 4B). At 12 weeks of age, an interaction between early-life vitamin C and cysteine deficiencies was observed for GPx and GR, as the activities of the enzyme in VCD and CD groups decreases while it increases in DD (Figures 4A and 4B).

3.5. Energy metabolism enzymes

At 1 week of life, only the activity of PFK was increased by vitamin C and cysteine deficiencies (Figure 5B). However, specific activities of GCK and PFK were increased by both deficiencies (Figures 5G and 5H) while that of ACC was increased only in cysteine deficient groups (Figure 5I). These changes in specific activities corresponded to a decrease in protein levels (Figures 5D, 5E and 5F). There was no sex effect on these parameters.

At 12 weeks of life, GCK activity and its protein levels were not affected by any of the deficiencies (Figures 5A and 5D). PFK activity was higher in males, compared to females (Figure 5B). No effect was observed in its protein levels (Figure 5E), suggesting stimulatory post-translational activity in males but not in females, however specific activity was not statistically affected (Figure 5H). ACC activity was not affected either (Figure 5C), but since its protein levels increased in all deficient groups (Figure 5F), its specific activity decreased (Figure 5I), which represents an inhibitory post-translational modification. ACC specific activity was also increased in females (+40%).

3.6. Developmental change

According to the hypothesis of the study, the metabolic maturation is disturbed by early life oxidative stress. Thus, it is important to compare the activity of key enzymes between 1 and 12 weeks of life (Figure 6).

The activity and protein level of GCK (Figure 6A and D) were not statistically affected by age within each group. PFK activity was not significantly changed in the control group, but it was increased in all three deficiency groups (Figure 6B). PFK protein levels (Figure 6E) decreased with age in the control group but remained stable in deficient animals throughout life. ACC activity was decreased in the control group with age, with parallel decreases in deficiency groups (Figure 6C). ACC protein levels (Figure 6F) decreased with age in the control group, did not change in VCD animals, and increased in both CD and DD, showing different patterns from the control group.

4. Discussion

The study shows that vitamin C and cysteine deficiencies during the neonatal period share some similarities in their short- and long-term impact in addition to having some specific effects. The

results support the initial hypothesis that neonatal oxidative stress can induce an adult-like phenotype of the energy metabolism in the liver of newborns.

At 1 week of life, both deficiencies generated oxidative stress, by reducing the levels of GSH and oxidizing the redox potential. Similar oxidation of hepatic redox potential has already been observed in a similar model of neonatal antioxidant deficiencies (35). It is intuitive that cysteine deficiency would decrease GSH levels, as cysteine is the limiting substrate for GSH synthesis [28,40]. However, vitamin C deficiency also caused a similar decrease in GSH levels, while also decreasing its own levels. Given the difference in their hepatic concentrations, the regeneration of ascorbate from dehydroascorbate [41,42] by GSH does not completely explain the entire decrease in GSH. The increased levels of Nrf2 in deficient animals and the lack of difference in GSSG levels and glutathione reductase activity do not suggest a lower synthetic capacity or recycling of GSH. This surprising observation remains without explanation, but it is of importance to investigate knowing that large parts of the population have suboptimal vitamin C levels [43–47]. This low GSH level explains the oxidation of redox potential, a marker of oxidative stress. The magnitude of the stress was not sufficient to simulate NF- κ B but sufficient to stimulate Nrf2, which characterizes this as a mild oxidative stress [48]. These two transcription factors are sensitive to the redox environment. NF- κ B is associated with pro-inflammatory cytokine production [49–51] and Nrf2 promotes the expression of genes associated with antioxidant defense such as glutathione peroxidase and genes involved in synthesis of glutathione [52,53].

Despite VCD and CD inducing a similar response on glutathione metabolism at one week of life, at 12 weeks they differ. By this age, neonatal vitamin C deficiency was associated with lower levels of GSH (– 16%) while neonatal cysteine deficiency was followed by an increased GSH (+ 21%) levels. Their effects were additive as GSH level in double deficiency group did not differ from control. Vitamin C deficiency remains without effect on GSSG, while neonatal cysteine deficiency was associated with a greater level of GSSG. Therefore, the redox value in the cysteine deficiency groups remains similar to that one of the control group whereas it was more oxidized in animals with neonatal vitamin C deficiency. The high level of GSH and GSSG in the cysteine deficient group could explain the low level of nuclear Nrf2. However, the low Nrf2 level in the vitamin C deficiency is inconsistent with the low GSH and high redox potential in these animals. The mechanism leading to this low nuclear Nrf2 level in the VCD group remains to be determined.

At one week of life, the protein levels of all 3 enzymes were lower than those of the control group, except for the vitamin C deficiency group for ACC. The absence of change in GCK and ACC activities, and even an increase in PFK activity, in the deficiency groups, suggests a post-translational stimulation that counteracts the decrease in protein levels. It is known that an oxidizing environment influences the activity of all these enzymes [16,36,54,55]. For instance, ACC activity is controlled by phosphorylation through the redox-sensitive enzymes, AMPK and PP2A [56]. Therefore, the oxidized redox potential observed in deficient groups could induce inhibition of PP2A, allowing ACC to remain phosphorylated and more active. Eleven weeks after stopping the deficient diets, the values of redox potential and the protein levels and activity of GCK and the activity of ACC were not different among groups.

Prenatal metabolism is characterized by high glycolytic and lipogenic rates, as the lack of oxygen allows energy production from glycolysis and storage of pyruvate as triglycerides. At birth, glycolytic rates slowly decrease and remain low until adulthood as oxygen increases the ATP yield, while lipogenesis plummets at the first days of life and slightly increases at adulthood [57,58]. Comparisons of the values observed at 1 and 12 weeks of life support the hypothesis that oxidative stress can induce an adult-like phenotype of energy metabolism in newborns at the level of protein expression, as the lower levels of glycolytic enzymes found at 1 week of life in deficient animals are similar to the ones observed at adult life in controls. The relationship between the redox potential of glutathione and DNA methylation in the liver of one week old guinea pigs has been previously reported. Oxidation of redox potential strongly correlated with increased methylation [59,60], while the methylation of the glucokinase gene promoter was increased with age and associated with the risk of metabolic disease [61,62]. If this relationship could explain our observation, it suggests also that methylation of DNA during neonatal period may not be permanent. Further studies would investigate the hypothesis that a high redox potential promotes higher methylation of genes encoding enzymes of energy metabolism, and that these genes could be demethylated if redox value changes to a lower value.

The particular case of the neonatal cysteine deficiency is interesting. At 12 weeks of age, these animals presented higher PFK activities, which stimulate glycolysis and provide acetyl-CoA, the substrate for ACC. Therefore, even if activity of ACC, the limiting step in fatty acids synthesis, was without observable change, the increased amount of substrate should result in a greater production of fatty acids *in vivo*. This is particularly important in an environment where the post-

translational repression observed is removed, and ACC is more active [63,64]. In brief, the data alert us that neonatal cysteine deficiency may induce a greater risk of fatty liver in adulthood.

Beyond these biochemical changes, a modification in the phenotype was also observable. The fact that after 11 weeks on a normal-standard diet the food intake was 40% lower in animals that received a deficient diet at neonatal age, supports an impairment of energy metabolism. However, this large difference did not seem to influence body weight at this age. In a similar animal model, it has been observed a lower spontaneous physical activity 13 weeks after receiving parenteral nutrition during their first week of life (17). Animals from the cysteine deficiency group were also less physically active at 5 weeks of life. Parenteral nutrition also led to a deficiency in glutathione due to a lack of cysteine [17,65]. This spontaneous decline in physical activity in adulthood has been associated with an overall energy deficiency [17].

The initial hypothesis and the aim of the study concerned the impact of neonatal vitamin C and cysteine deficiencies. Sex was not determined to be an important factor for the variables measured in this study at neonatal age. However, we observed that females had increased GSSG and nuclear NF- κ B, and an increased ACC specific activity, while also having a decreased PFK activity and cytoplasmic Nrf2 compared to males at 12 weeks of life. These differences seem to be associated with development of the animals as these are not present early in life and there were no interactions between sex and any of the deficient diets. The increase in nuclear NF- κ B seems to be associated with the oxidation of redox potential of glutathione only in females, which has been demonstrated before [27,66,67]. This makes females particularly at risk of developing inflammatory diseases.

This study is one of the few to investigate the effects of neonatal nutrition on programming energy metabolism later in life. The guinea pig is an adequate model to study the developmental origins of health and disease as their perinatal development is similar to human [68]. The guinea pig is the only mammal along with primates and humans whose vitamin C level can be lowered by a deficient diet because ascorbate is an essential vitamin in these species [18]. Another strength of this study is the use of outbred animals, which allows higher genetic variability and a robust model. In our model we were limited to the impacts of these nutritional deficiencies in the liver, while we are aware that they could affect energy and redox metabolism in other organs, such as muscle [69], lungs [70] and brain [71]. Another limit of this study is the decrease in food intake in animals receiving a diet deficient in cysteine at 1 week of age. Although these animals were still feeding,

they lost weight, and it is impossible to determine the contribution of this lower energy intake at neonatal life on the results observed. Although cysteine plays a role in taste [72], and that taste perception is primordial for food intake and growth of guinea pigs [73], there is no evidence that cysteine or methionine could have an orexigenic effect [74]. This decrease in food intake remains to be confirmed or explained. Our findings create new investigation opportunities to understand the fine biochemical mechanisms linking these nutritional deficiencies to observations.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study to report the programming effects of vitamin C and cysteine deficiency in energy and glutathione metabolism, although many studies have observed the short-term effects of antioxidant deficiencies in guinea pigs [75–79]. The study highlighted the dual importance of preventing these nutritional deficiencies in the newborn, for their immediate health and their health throughout their lifetime. These deficiencies are frequent, particularly in premature newborn under parenteral nutrition. According to the data presented in this study, these deficiencies induce an adult-like phenotype of energy metabolism at neonatal life, while also increasing the risk of fatty liver disease at adult life. Further studies aimed at improving PN formulations in order to prevent these deficiencies are essential, especially in females, who seem to be more responsive to oxidative stress later in life and may develop more inflammation.

Author Contributions: Conceptualization, V.T and J-C.L.; methodology, V.T and J-C.L.; validation, V.T.; formal analysis, V.T and J-C.L.; investigation, V.T.; writing—original draft preparation, V.T.; writing—review and editing, J-C.L. and I.M.; visualization, V.T.; supervision, J-C.L.; project administration, V.T.; funding acquisition, J-C.L. and I.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (PJT-148522)

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of the CHU Sainte- Justine Research Centre (protocol #739)

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

References

1. Hitchler, M.J.; Domann, F.E. The epigenetic and morphogenetic effects of molecular oxygen and its derived reactive species in development. *Free Radic. Biol. Med.* 2021.
2. Martin, A.; Faes, C.; Debevec, T.; Rytz, C.; Millet, G.; Pialoux, V. Preterm birth and oxidative stress: Effects of acute physical exercise and hypoxia physiological responses. *Redox Biol.* 2018, 17, 315–322.
3. Saphier, O.; Schneid-Kofman, N.; Silberstein, E.; Silberstein, T. Does mode of delivery affect neonate oxidative stress in parturition? Review of literature. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2012, 287, 403–406.
4. Dengler, V.L.; Galbraith, M.D.; Espinosa, J.M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2014, 49, 1–15.
5. Mohamed, I.; Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.-C. Oxygen and parenteral nutrition two main oxidants for extremely preterm infants: “It all adds up”. *J. Neonatal Perinat. Med.* 2015, 8, 189–197.
6. Repa, A.; Binder, C.; Thanhaeuser, M.; Kreissl, A.; Pablik, E.; Huber-Dangl, M. A mixed lipid emulsion for prevention of parenteral nutrition associated cholestasis in extremely low birth weight infants: A randomized clinical trial. *J. Pediatr.* 2018, 194, 87–93.e1.
7. Ozsurekci, Y.; Aykac, K. Oxidative stress related diseases in newborns. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, 2768365.
8. Flahault, A.; Paquette, K.; Fernandes, R.O.; Delfrate, J.; Cloutier, A.; Henderson, M. Increased incidence but lack of association between cardiovascular risk factors in adults born preterm. *Hypertension* 2020, 75, 796–805.
9. South, A.M.; Nixon, P.A.; Chappell, M.C.; Diz, D.I.; Russell, G.B.; Jensen, E.T. Renal function and blood pressure are altered in adolescents born preterm. *Pediatr. Nephrol.* 2018, 34, 137–144.
10. Parkinson, J.R.; Hyde, M.J.; Gale, C.; Santhakumaran, S.; Modi, N. Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: A systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 2013, 131, e1240–e1263.

11. Breijl, L.M.; Kerkhof, G.F.; Hokken-Koelega, A.C. Risk for nonalcoholic fatty liver disease in young adults born preterm. *Horm. Res. Paediatr.* 2015, 84, 199–205.
12. Vohr, B.R.; Heyne, R.; Bann, C.; Das, A.; Higgins, R.D.; Hintz, S.R.; Jobe, A.H.; Caplan, M.S.; Polin, R.A.; Laptook, A.R.; et al. Extreme preterm infant rates of overweight and obesity at school age in the SUPPORT neuroimaging and neurodevelopmental outcomes cohort. *J. Pediatr.* 2018, 200, 132–139.e3.
13. Knafo, L.; Chessex, P.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin. Chem.* 2005, 8, 1462–1471.
14. Lavoie, J.-C.; Bélanger, S.; Spalinger, M.; Chessex, P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997, 99, e6.
15. Lavoie, J.-C.; Chessex, P.; Rouleau, T.; Tsopmo, A.; Friel, J. Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs. *Clin. Nutr.* 2007, 26, 341–347.
16. Teixeira, V.; Guiraut, C.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Neonatal parenteral nutrition affects the metabolic flow of glucose in newborn and adult male Hartley guinea pigs' liver. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2020, 3, 1–12.
17. Kleiber, N.; Chessex, P.; Rouleau, T.; Nuyt, A.-M.; Perreault, M.; Lavoie, J.-C. Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition. *Pediatr. Res.* 2010, 68, 188–192.
18. Burns, J.J. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature* 1957, 4585, 553.
19. May, J.M.; Qu, Z.-C.; Mendiratta, S. Protection and recycling of α -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 349, 281–289.
20. Wang, T.; Chen, K.; Zeng, X.; Yang, J.; Wu, Y.; Shi, X.; Qin, B.; Zeng, L.; Esteban, M.A.; Pan, G.; et al. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 2011, 9, 575–587.

21. Minor, E.A.; Court, B.L.; Young, J.I.; Wang, G. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 13669–13674.
22. Hirsilä, M.; Koivunen, P.; Günzler, V.; Kivirikko, K.I.; Myllyharju, J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 30772–30780.
23. Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 1191–1212.
24. Huseby, N.-E.; Sundkvist, E.; Svineng, G. Glutathione and sulfur containing amino acids: Antioxidant and conjugation activities. In *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 93–120.
25. Pallardó, F.V.; Markovic, J.; Viña, J. Cellular compartmentalization of glutathione. In *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 35–45.
26. Dinkova-Kostova, A.T.; Holtzclaw, W.D.; Cole, R.N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M.; Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 11908–11913.
27. Jung, Y.; Kim, H.; Sun, H.M.; Sue, G.R.; Jeong, W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF- κ B through the redox-dependent interaction with I κ B α . *J. Biol. Chem.* 2008, 35, 23863–23871.
28. Lavoie, J.-C.; Rouleau, T.; Truttmann, A.C.; Chessex, P. Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic. Res.* 2002, 36, 811–817.
29. Martensson, J.; Han, J.; Griffith, O.W.; Meister, A. Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 317–321.
30. Martensson, J.; Meister, A. Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: Ascorbate spares glutathione and protects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 4656–4660.

31. National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals; National Academies Press: Washington, DC, USA, 1995; p. 192.
32. Dresler, S.; Maksymiec, W. Capillary zone electrophoresis for determination of reduced and oxidised ascorbate and glutathione in roots and leaf segments of *Zea mays* plants exposed to Cd and Cu. *Acta. Sci. Pol. Hortorum Cultus* 2013, 12, 143–155.
33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 1–2, 248–254.
34. Kudo, N.; Barr, A.J.; Barr, R.L.; Desai, S.; Lopaschuk, G.D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 1995, 29, 17513–17520.
35. Maghdessian, R.; Côté, F.; Rouleau, T.; Ouadda, A.B.D.; Levy, É.; Lavoie, J.-C. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the lipid metabolism in newborn guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010, 334, 278–284.
36. Turcot, V.; Rouleau, T.; Tsopmo, A.; Germain, N.; Potvin, L.; Nuyt, A.-M.; Lavoie, J.-C. Long-term impact of an antioxidantdeficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, 47, 275–282. .
37. Mustafi, S.; Camarena, V.; Qureshi, R.; Yoon, H.; Volmar, C.-H.; Huff, T.C.; Sant, D.W.; Zheng, L.; Brothers, S.P.; Wahlestedt, C.; et al. Vitamin C supplementation expands the therapeutic window of BETi for triple negative breast cancer. *EBioMedicine* 2019, 43, 201–210.
38. Cui, Y.; Otsuka, M.; Fujiwara, Y. Reduction of dehydroerythorbic acid in vitamin C-deficient guinea pigs. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 2001, 47, 316–320.
39. Frikke-Schmidt, H.; Tveden-Nyborg, P.; Lykkesfeldt, J. L-dehydroascorbic acid can substitute l-ascorbic acid as dietary vitamin C source in guinea pigs. *Redox Biol.* 2016, 7, 8–13.
40. Beatty, P.; Reed, D.J. Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1981, 30, 1227–1230.

41. Wells, W.W.; Xu, D.P.; Yang, Y.F.; Rocque, P.A. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 1990, 26, 15361–15364.
42. Paolicchi, A.; Pezzini, A.; Saviozzi, M.; Piaggi, S.; Andreuccetti, M.; Chieli, E.; Malvaldi, G.; Casini, A.F. Localization of a GSH-dependent dehydroascorbate reductase in rat tissues and subcellular fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, 333, 489–495.
43. Cahill, L.; Corey, P.N.; El-Sohemy, A. Vitamin C deficiency in a population of young canadian adults. *Am. J. Epidemiol.* 2009, 170, 464–471.
44. Rowe, S.; Carr, A.C. Global vitamin c status and prevalence of deficiency: A cause for concern? *Nutrients* 2020, 12, 2008.
45. Schleicher, R.L.; Carroll, M.D.; Ford, E.S.; Lacher, D.A. Serum vitamin C and the prevalence of vitamin C deficiency in the United States: 2003–2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 90, 1252–1263.
46. De Oliveira, A.M.; Rondo, P.R.D.C.; Mastroeni, S.S.; Oliveira, J.M. Plasma concentrations of ascorbic acid in parturients from a hospital in Southeast Brazil. *Clin. Nutr.* 2008, 27, 228–232.
47. Ravindran, R.D.; Vashist, P.; Gupta, S.K.; Young, I.; Maraini, G.; Camparini, M.; Jayanthi, R.; John, N.; Fitzpatrick, K.E.; Chakravarthy, U.; et al. Prevalence and risk factors for vitamin C deficiency in North and South India: A two centre population based study in people aged 60 years and over. *PLoS ONE* 2011, 6, e28588.
48. Lushchak, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 2014, 224, 164–175.
49. Libermann, T.A.; Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 1990, 5, 2327–2334.
50. Sica, A.; Tan, T.H.; Rice, N.; Kretzschmar, M.; Ghosh, P.; Young, H.A. The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-κB binds to the intronic region of the human interferon-γ gene at a site related to an interferon- stimuable response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 5, 1740–1744.

51. Arima, N.; Matsushita, K.; Obata, H.; Ohtsubo, H.; Fujiwara, H.; Arimura, K. NF- κ B involvement in the activation of primary adult T-cell leukemia cells and its clinical implications. *Exp. Hematol.* 1999, 7, 1168–1175.
52. Banning, A.; Deubel, S.; Kluth, D.; Zhou, Z.; Brigelius-Flohé, R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25, 4914–4923.
53. Agyeman, A.S.; Chaerkady, R.; Shaw, P.G.; Davidson, N.E.; Visvanathan, K.; Pandey, A. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012, 1, 175–187.
54. Tippett, P.S.; Neet, K.E. Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983, 222, 285–298.
55. Gilbert, H.F. Biological disulfides: The third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 12086–12091.
56. Rao, R.K.; Clayton, L.W. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293, 610–616.
57. Ballard, F.J.; Hanson, R.W. Changes in lipid synthesis in rat liver during development. *Biochem. J.* 1967, 102, 952–958.
58. Burch, H.B.; Lowry, O.H.; Kuhlman, A.M.; Slerjance, J.; Diamant, E.J.; Lowry, S.R. Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver. *J. Biol. Chem.* 1963, 238, 2267–2273.
59. Lengo, A.M.; Guiraut, C.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Relationship between redox potential of glutathione and DNA methylation level in liver of newborn guinea pigs. *Epigenetics* 2020, 15, 1348–1360.
60. Yara, S.; Levy, E.; Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.-C. Total parenteral nutrition induces sustained hypomethylation of DNA in newborn guinea pigs. *Pediatr. Res.* 2013, 73, 592–595.
61. Jiang, M.H.; Fei, J.; Lan, M.S.; Lu, Z.P.; Liu, M.; Fan, W.W.; Gao, X.; Lu, D.R. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 2008, 51, 1525–1533.

62. Jiang, M.; Zhang, Y.; Liu, M.; Lan, M.S.; Fei, J.; Fan, W.; Gao, X.; Lu, D.R. Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinology* 2011, 152, 1284–1289. .
63. Mao, J.; DeMayo, F.J.; Li, H.; Abu-Elheiga, L.; Gu, Z.; Shaikenov, T.E. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 22, 8552–8557.
64. Ishimoto, T.; Lanaspá, M.A.; Rivard, C.J.; Roncal-Jimenez, C.A.; Orlicky, D.J.; Cicerchi, C.; McMahan, R.H.; Abdelmalek, M.F.; Rosen, H.R.; Jackman, M.R.; et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology* 2013, 58, 1632–1643.
65. Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Inhibition of hepatic methionine adenosyltransferase by peroxides contaminating parenteral nutrition leads to a lower level of glutathione in newborn Guinea pigs. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 53, 2250–2255.
66. Klein, S.L.; Flanagan, K.L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2016, 16, 626–638.
67. Dunn, S.E.; Ousman, S.S.; Sobel, R.A.; Zuniga, L.; Baranzini, S.E.; Youssef, S. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2007, 2, 321–330.
68. Morrison, J.L.; Botting, K.J.; Darby, J.R.T.; David, A.L.; Dyson, R.M.; Gatford, K.L.; Gray, C.; Herrera, E.A.; Hirst, J.J.; Kim, B.; et al. Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J. Physiol.* 2018, 596, 5535–5569.
69. Morin, G.; Guiraut, C.; Marcogliese, M.P.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Glutathione supplementation of parenteral nutrition prevents oxidative stress and sustains protein synthesis in guinea pig model. *Nutrients* 2019, 11, 2063.
70. Elremaly, W.; Mohamed, I.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Adding glutathione to parenteral nutrition prevents alveolar loss in newborn Guinea pig. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 87, 274–281.
71. Cisternas, P.; Martínez, F.; Fernandez, E.; Ferrada, L.; Oyarce, K.; Salazar, K.; Bolanos, J.P.; Nualart, F.; Silva-Alvarez, C. The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *J. Neurochem.* 2014, 129, 663–671.

72. Roudot-Algaron, F. Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines: Exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Lait* 1996, 4, 313–348.
73. Thorn, S.L.; Young, G.S.; Kirkland, J.B. The guinea-pig is a poor animal model for studies of niacin deficiency and presents challenges in any study using purified diets. *Br. J. Nutr.* 2007, 98, 78–85.
74. Reid, M.E.; Mickelsen, O. Nutritional studies with the guinea pig. VII. Effect of different proteins, with and without amino acid supplements, on growth. *J. Nutr.* 1963, 80, 25–32.
75. Burk, R.F.; Christensen, J.M.; Maguire, M.J.; Austin, L.M.; Whetsell, W.O.; May, J.M.; Hill, K.E.; Ebner, F.F. A combined deficiency of vitamins E and C causes severe central nervous system damage in guinea pigs. *J. Nutr.* 2006, 136, 1576–1581.
76. Hill, K.E.; Motley, A.K.; May, J.M.; Burk, R.F. Combined selenium and vitamin C deficiency causes cell death in guinea pig skeletal muscle. *Nutr. Res.* 2009, 3, 213–219.
77. Barja, G.; López-Torres, M.; Pérez-Campo, R.; Rojas, C.; Cadenas, S.; Prat, J.; Pamplona, R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, 17, 105–115.
78. Schjoldager, J.G.; Paidi, M.D.; Lindblad, M.M.; Birck, M.M.; Kjærgaard, A.B.; Dantzer, V. Maternal vitamin C deficiency during pregnancy results in transient fetal and placental growth retardation in guinea pigs. *Eur. J. Nutr.* 2015, 4, 667–676.
79. Paidi, M.D.; Schjoldager, J.G.; Lykkesfeldt, J.; Tveden-Nyborg, P. Prenatal vitamin C deficiency results in differential levels of oxidative stress during late gestation in foetal guinea pig brains. *Redox Biol.* 2014, 2, 361–367.

Table 1 *Nutritional composition of diets used in the study.*

	Control Diet (C)	Vitamin C Deficient Diet (VCD)	Cysteine Deficient Diet (CD)	Double Deficiency Diet (DD)	Long term standard Diet
Energy (kcal/g)	3.5	3.5	3.5	3.5	2.4
Protein (% kcal)	18.4	18.4	18.4	18.4	32
Carbohydrate (% kcal)	55.7	55.7	55.7	55.7	18
Fat (% kcal)	25.9	25.9	25.9	25.9	50
L-alanine (g/kg)	3.65	3.65	4.01	4.01	9
L-aspartic acid (g/kg)	3.65	3.65	4.19	4.19	17
L-cystine (g/kg)	2.70	2.70	-	-	3
L-glutamic acid (g/kg)	41.67	41.67	42.27	42.27	27
Glycine (g/kg)	24.45	24.45	24.76	24.76	10
L-methionine (g/kg)	2.90	2.90	2.00	2.00	3
L-proline (g/kg)	3.65	3.65	4.12	4.12	11
L-serine (g/kg)	3.65	3.65	4.08	4.08	10
Vitamin C (mg/kg)	203	-	203	-	1050

Table 2 Basal characteristics at 1 and 12 weeks of life depending on neonatal diet.

	1-week-old animals				12-week-old animals			
	Control (C)	Vitamin C Deficient (VCD)	Cysteine Deficient (CD)	Double Deficiency (DD)	Control (C)	Vitamin C Deficient (VCD)	Cysteine Deficient (CD)	Double Deficiency (DD)
Bodyweight at day 3 (g)	113 ± 4	100 ± 3	107 ± 3	107 ± 3	107 ± 4	100 ± 3	105 ± 3	99 ± 4
Bodyweight at sacrifice (g)	124 ± 4	107 ± 4**	104 ± 2**	101 ± 3**	577 ± 25	588 ± 34	599 ± 29	558 ± 21
Body weight change from day 3 to sacrifice (%)	110 ± 3	107 ± 1	97 ± 1***	94 ± 1***	542 ± 21	594 ± 40	575 ± 37	572 ± 31
Liver weight at sacrifice (g)	3.8 ± 0.4	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	18 ± 1.1	20 ± 1.7	18 ± 1.1	16 ± 0.7
Liver weight/bodyweight (%)	30 ± 2	32 ± 1	31 ± 1	33 ± 1	31 ± 1	34 ± 2	29 ± 1**	30 ± 1**

Data are reported as mean ± S.E.M. (n=8); **: p<0.01; ***: p<0.001.

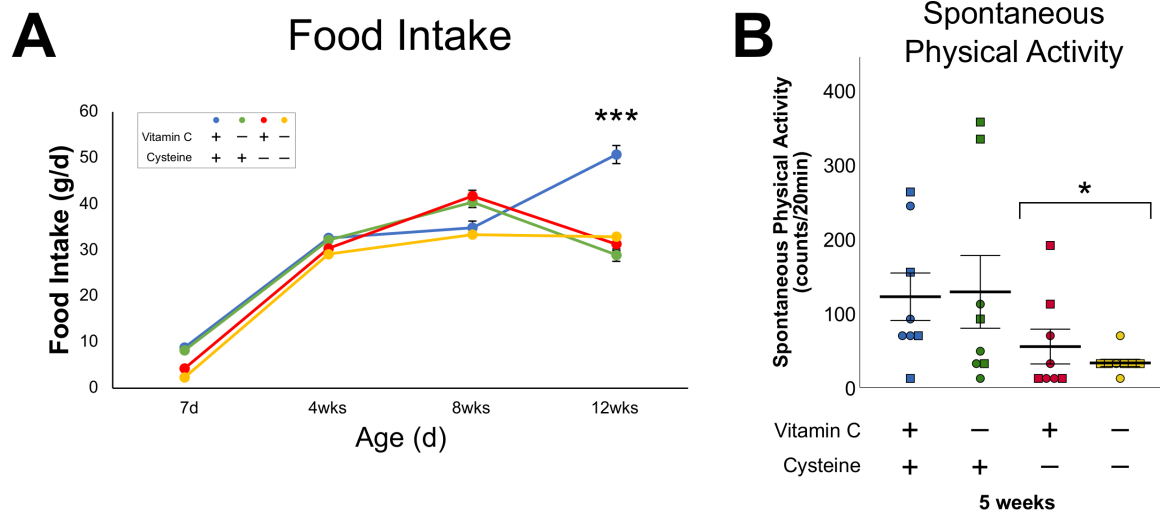
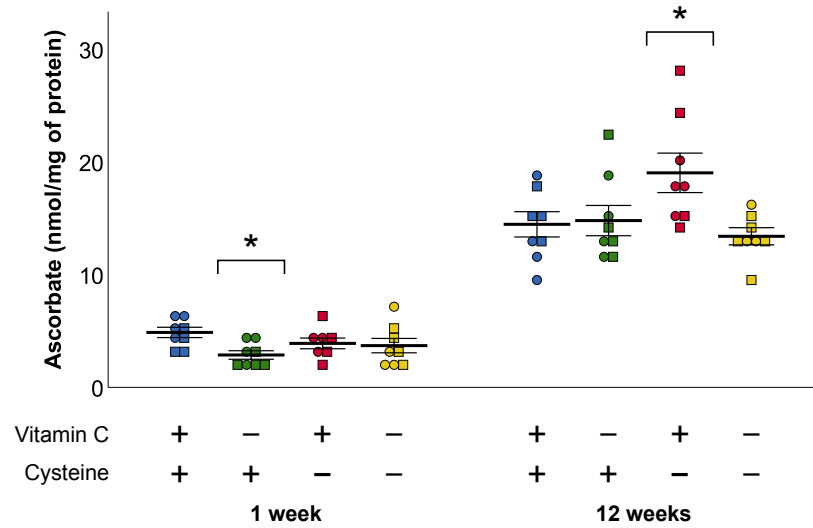
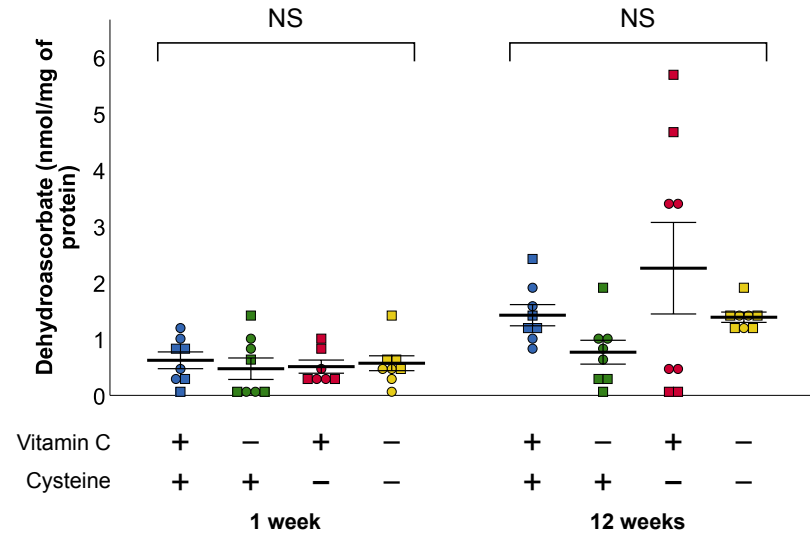


Figure 1. Food intake in animals at weeks 1, 4, 8 and 12 of life and spontaneous physical activity at 5 weeks of life. (A): Food intake evolved differently in animals according to the neonatal diets. Controls and double deficient animals evolved linearly ($r^2_C=0.76$; $r^2_{DD}=0.65$), while vitamin C deficient and cysteine deficient animals fitted in a quadratic model ($r^2_{VCD}=0.45$; $r^2_{CD}=0.41$). The food intake is significantly decreased in all deficient animals at 12 weeks of age. (B) Spontaneous physical activity at 5 weeks was significantly decreased in cysteine deficient animals. Data are reported as mean \pm S.E.M. Circles: male animals; squares: female animals; *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.

A**Ascorbate****B****Dehydroascorbate**

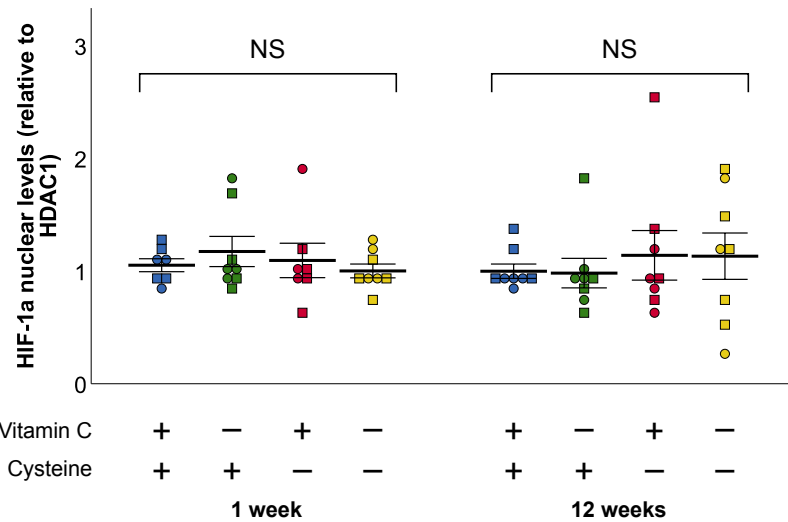
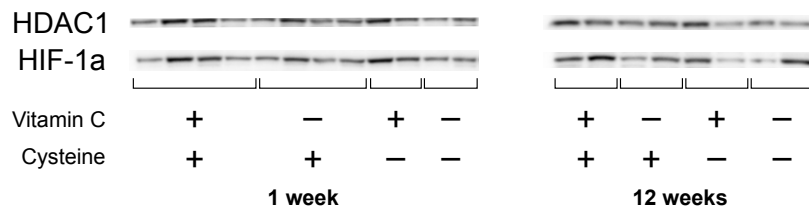
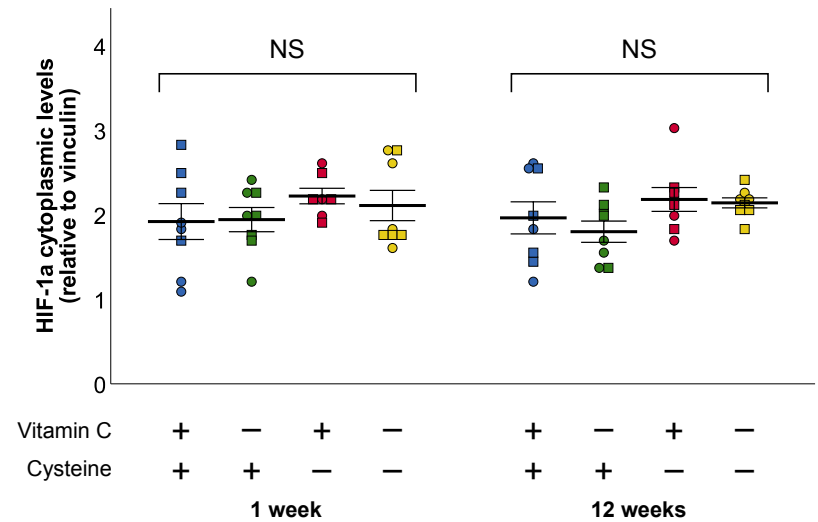
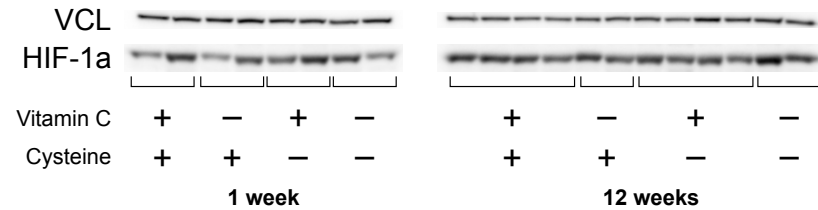
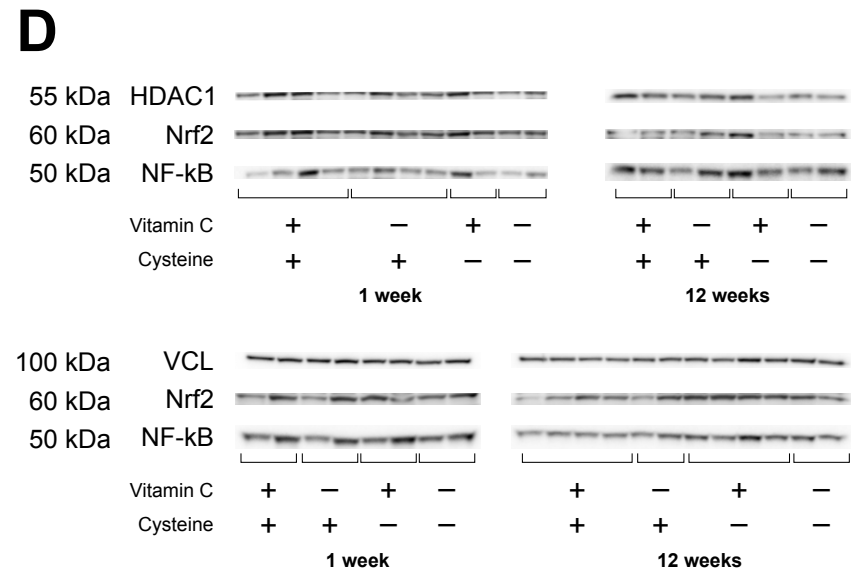
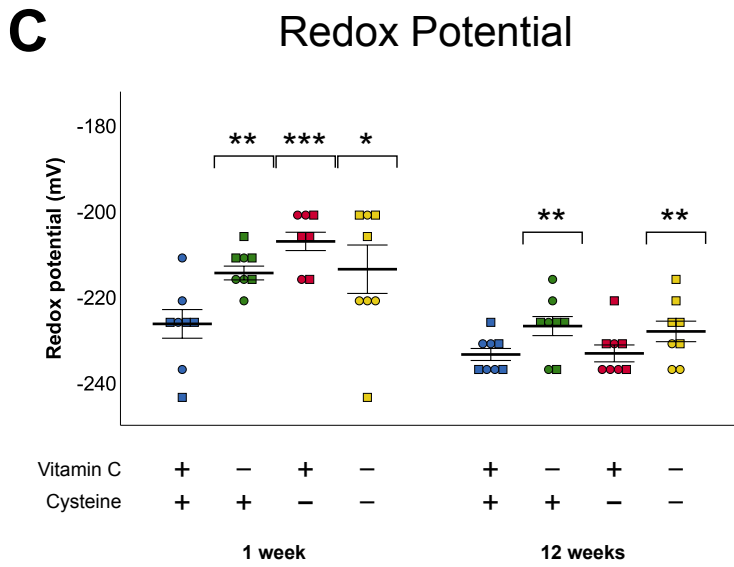
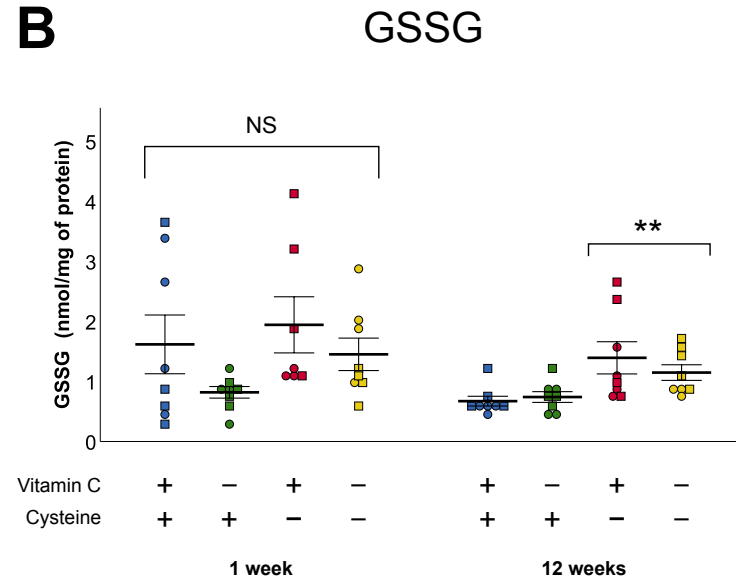
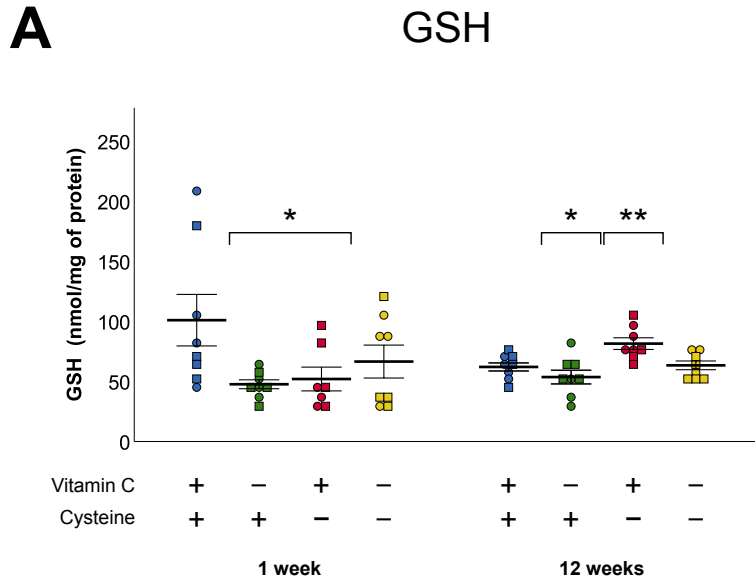
C**Nuclear HIF-1a****D****Cytoplasmic HIF-1a**

Figure 2. Hepatic levels of ascorbate, dehydroascorbate and HIF-1A in nucleus and cytoplasm in 1-week and 12-week animals. (A): Ascorbate levels were decreased at 1 week of life by vitamin C deficiency, and it was increased at 12 weeks of life in cysteine deficiency group, with a significant interaction between both deficiencies ($p < 0.05$). (B, C and D): No statistically significant differences were observed in dehydroascorbate or HIF-1 α levels in nucleus or cytoplasm either at 1 week of life or at 12 weeks. Data are reported as mean \pm S.E.M. Circles: male animals; squares: female animals; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$.



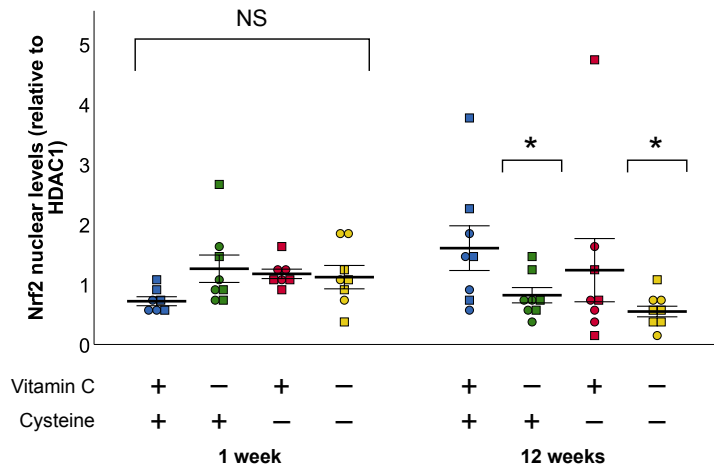
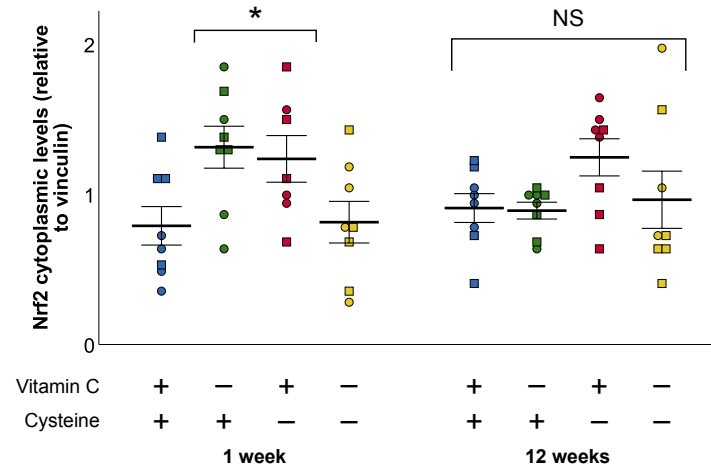
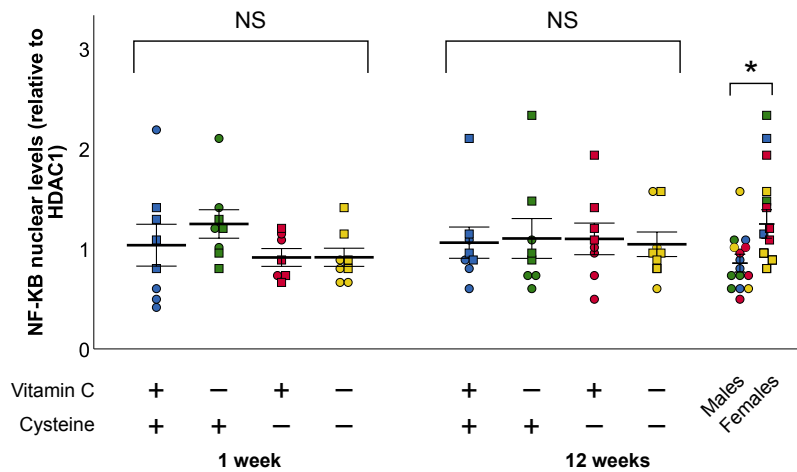
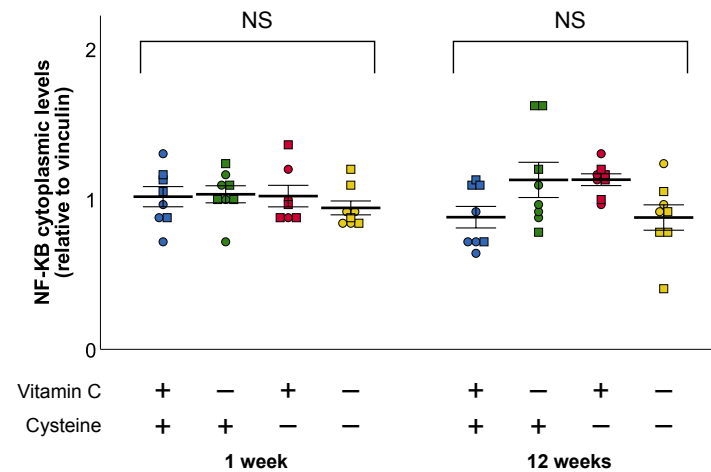
E**Nuclear Nrf2****F****Cytoplasmic Nrf2****G****Nuclear NF-KB****H****Cytoplasmic NF-KB**

Figure 3. Hepatic levels of GSH, GSSG, redox potential of glutathione, Nrf2 and NF- κ B in nucleus and cytoplasm in 1-week and 12-week animals. (A): GSH levels were decreased in vitamin C and cysteine deficient animals at 1 week of life. At 12 weeks of life, early-life vitamin C deficiency decreased GSH, while early-life cysteine deficiency increased it. (B): At 12 weeks, cysteine deficiency increased GSSG levels. (C): Redox potential of glutathione was oxidized (increased) by both deficiencies at 1 week of life. At 12 weeks, redox potential was oxidized by early-life vitamin C. (D): Western blot images from Nrf2 and NF- κ B, with HDAC1 and vinculin as reference proteins. (E): At 12 weeks of life, early-life vitamin C deficiency decreased nuclear Nrf2. (F): Cytoplasmic Nrf2 was increased in both vitamin C and cysteine deficiency animals at 1 week of life. (G): Females has increased nuclear NF- κ B at 12 weeks of life, compared to males. (H): No statistically significant differences were observed in NF- κ B levels in nucleus or cytoplasm either at 1 week of life or at 12 weeks. Data are reported as mean \pm S.E.M. Circles: male animals; squares: female animals; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

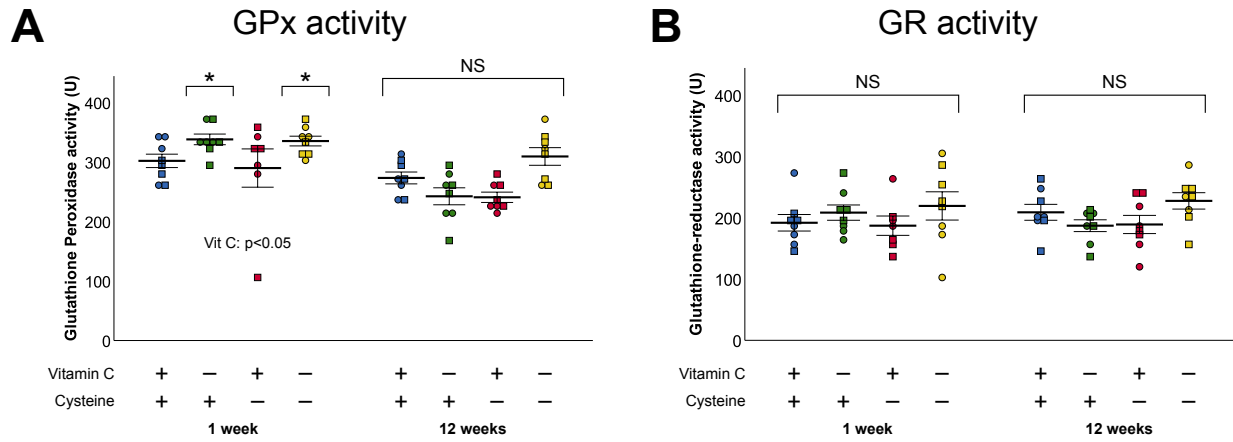
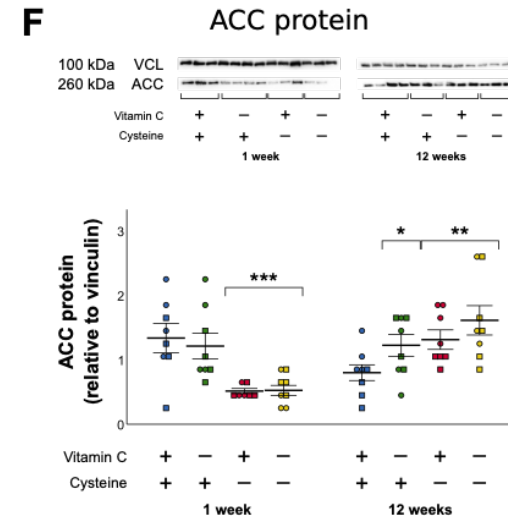
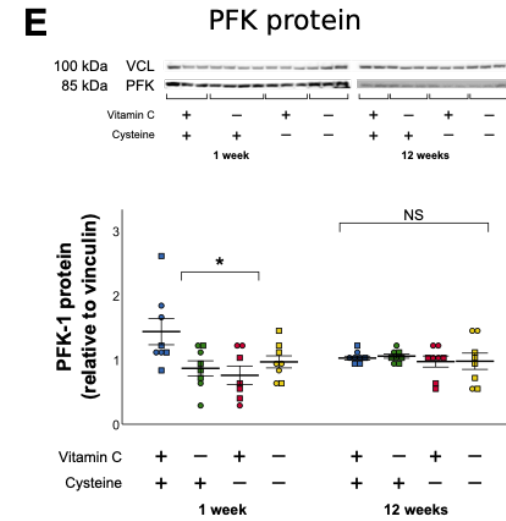
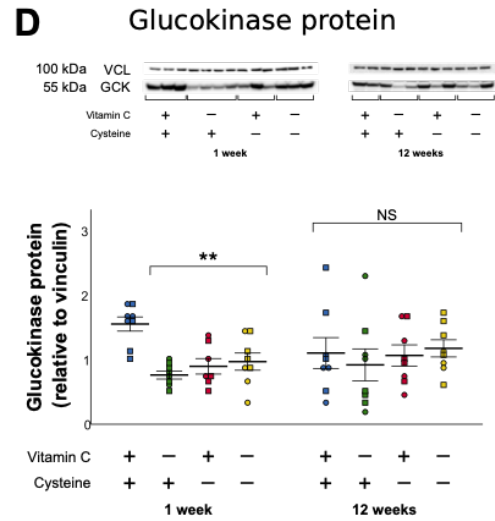
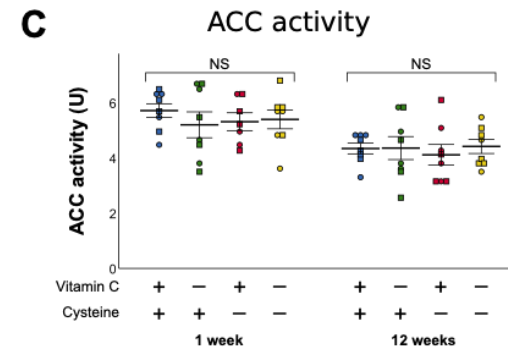
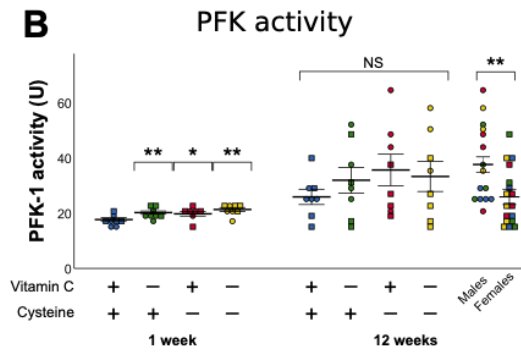
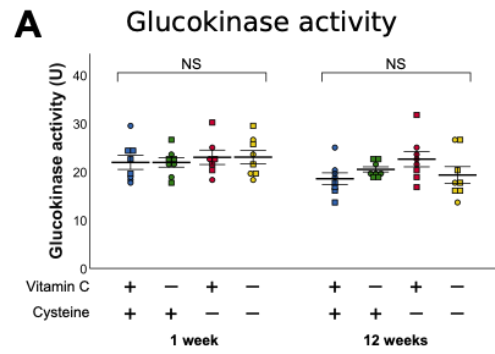


Figure 4. Activity of glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GR) in liver of 1-week and 12-week animals. (A): GPx activity was increased in vitamin C deficient animals at 1 week of life. At 12 weeks, early-life vitamin C and cysteine single deficiencies decreased GPx activity. (B): At 12 weeks, both neonatal vitamin C deficiency and cysteine deficiency decreased GR activity. Data are reported as mean \pm S.E.M. Circles: male animals; squares: female animals; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$.



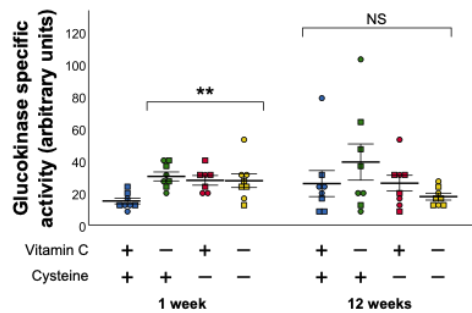
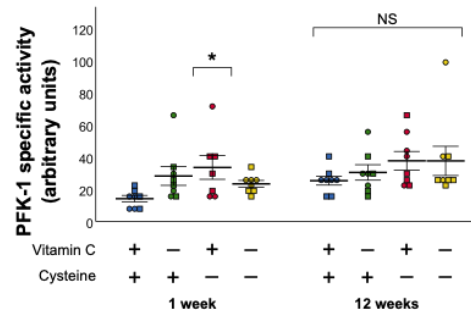
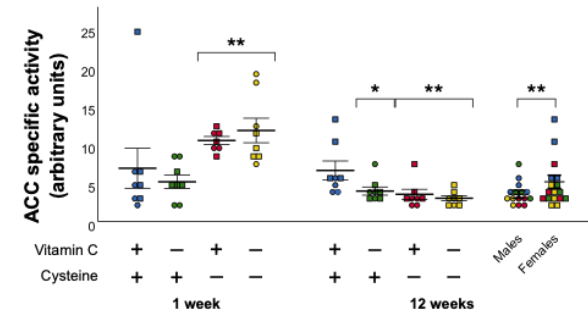
G Glucokinase specific activity**H** PFK specific activity**I** ACC specific activity

Figure 5. Hepatic activity, protein levels, and specific activity of glucokinase (GCK), phosphofruktokinase (PFK), and acetyl-CoA-carboxylase (ACC) in 1-week-old and 12-week-old animals. (A). No statistically significant differences were observed in GCK activity either at 1 week of life or at 12 weeks. (B). At 1 week of life, PFK activity was significantly increased by vitamin C and cysteine deficiency. At 12 weeks, PFK activity was increased in males, compared to females. (C). ACC activity was not significantly affected either at 1 week or at 12 weeks. (D). The protein levels of GCK were decreased at 1 week by both vitamin C and cysteine deficiency. (E). PFK protein levels were decreased at 1 week by both vitamin C and cysteine deficiencies. (F). ACC protein levels at 1 week were decreased by cysteine deficiency. At 12 weeks, ACC protein levels were increased by both early-life vitamin C and cysteine deficiencies, with a further additive effect of the double deficiency. (G). At 1 week of life, GCK specific activity was increased by vitamin C and cysteine deficiencies. (H). At 1 week of life, PFK specific activity was increased in all deficient groups. (I). ACC specific activity at 1 week was increased in cysteine deficient animals. At 12 weeks, it was independently decreased in neonatal vitamin C and cysteine deficient animals, as well as in males. Mean \pm SEM. Circles: male animals; squares: female animals; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

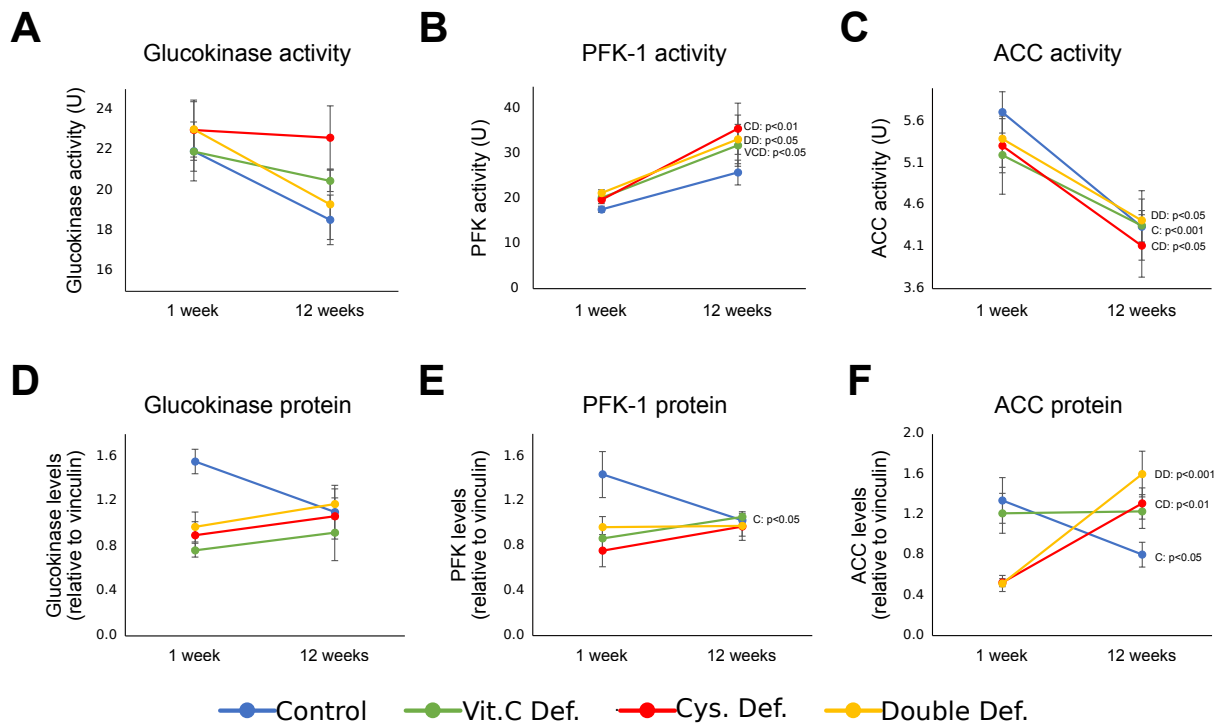


Figure 6. Developmental change of activity and protein levels of GCK, PFK and ACC in liver of 1-week and 12-week guinea pigs. (A): GCK activity does not significantly change with age in any of the groups. (B): PFK activity is not significantly increased in the control group with age, but it increases with age in all deficient groups. (C): ACC activity significantly decreases with age in control, cysteine deficient and double deficient groups. (D): GCK protein levels is not significantly affected by any of the neonatal deficiencies. (E): PFK protein levels decrease with age in control animals, but not in deficient groups. (F): ACC protein levels decrease with age in control animals, is not affected in vitamin C deficiency group and increases with age in both cysteine deficient animals. Data are reported as mean \pm S.E.M. C: Control group; VCD: vitamin C deficiency group; CD: Cysteine deficiency group; DD: Double deficiency group.

Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 2

Méthylation globale de l'ADN hépatique

Méthode

Deux-cents milligrammes de foie ont été homogénéisés dans 2680 μ L de tampon d'extraction (20mM Tris-HCl pH 8, 10mM NaCl, 1mM EDTA). Deux-cents microlitres de SDS 10% et 120 μ L de protéinase K (#19131, Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada) ont été ajoutés et les échantillons étaient incubés à 37°C durant 16h. Ensuite, 3mL d'une solution saturée en phénol étaient ajoutés aux échantillons, suivi d'une centrifugation à 1700xg/10min. La couche aqueuse était prélevée et cette étape était répétée. Sur la couche aqueuse issue de la deuxième centrifugation, 2,7mL d'une solution de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) ont été ajoutés aux échantillons. Ceux-ci étaient centrifugés à 1700xg/10min et la couche alcoolique était prélevée et soumise au même processus une deuxième fois. Une solution d'ARNase A (20 μ L) (#AC118, Omega Bio-tek, Norcross, GA, É.-U.) a été ajoutée et les échantillons ont été incubés à température pièce pendant 5 min. Deux-cents microlitres d'acétate de sodium 3M, pH 5.2 ont été rajoutés à la solution, suivis de 6mL d'éthanol 100% à -20°C. Le précipité a été rincé avec l'éthanol 70%, et séché à température pièce pendant 15 min. Le précipité a été dilué dans 150 μ L de tampon d'éluion (10mM Tris-HCl pH 8, 0.1mM EDTA) et la concentration et la qualité de l'ADN ont été mesurés par spectrophotométrie à 260nm et 280nm de longueur d'onde.

Quatre microgrammes d'ADN dans 50 μ L de tampon d'éluion étaient dénaturés en simple brin à 95°C/5min et ensuite traités avec 15 μ L d'acétate de sodium 200mM, pH 5.2 et 5 unités de Nucléase P1 (#M0660S, NewEngland Biolabs, Whitby, ON, Canada), et incubés 37°C/2h. Ensuite, 15 μ L de tampon Tris 1M, pH 7,5 et 5 unités de phosphatase alcaline (#P5931, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) ont été ajoutés aux échantillons qui étaient incubés à 37°C/1h. La mesure de la 5-méthylcytidine était réalisée par une ELISA compétitive avec un kit commercial (#STA-380, CellBiolabs, San Diego, CA, É.-U.).

Résultat

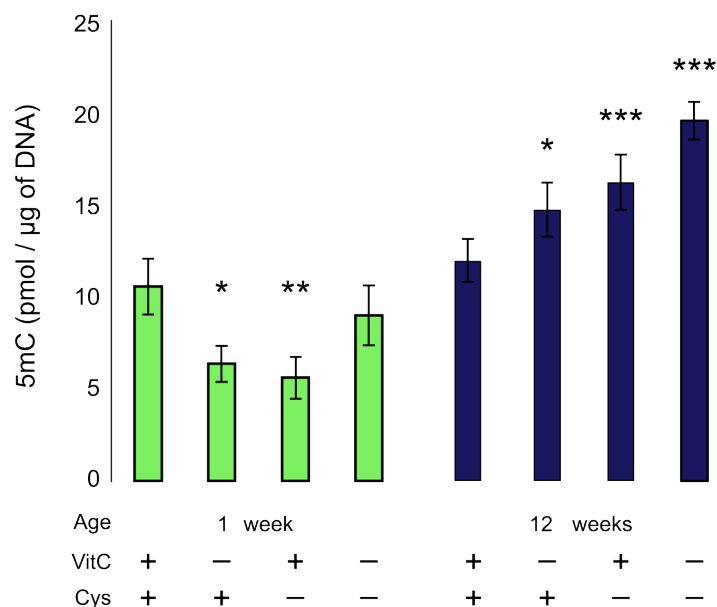


Figure 12 5-méthylcytosine hépatique chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.

À 1 semaine de vie, les diètes déficientes en vitamine C et en cystéine ont mené à une hypométhylation globale de l'ADN ($p < 0.05$). Une interaction significative entre les deux déficiences a été démontré aussi ($F_{\text{VitC} \times \text{Cys}(1,22)} = 10.53$; $p < 0.01$). Bien qu'aucun effet sexe n'a été démontré, une interaction entre le sexe et la déficience en vitamine C a été observée ($F_{\text{VitC} \times \text{Sexe}(1,22)} = 8.7$; $p < 0.01$) car l'effet observé chez les animaux ayant été nourris par une diète déficiente en vitamine C était significatif chez les femelles (45% de réduction; $p < 0.05$), mais pas chez les mâles (19% de réduction; $p > 0.05$).

À 12 semaines de vie, les effets des deux déficiences sont additifs, significatifs et ils mènent à une hyperméthylation globale de l'ADN ($F_{\text{VitC}(1,22)} = 5.6$; $p < 0.05$; $F_{\text{Cys}(1,22)} = 15.2$; $p < 0.001$). Aucun effet du sexe ni des interactions n'ont été observés.

Activité de TET

Méthode

Cent milligrammes de tissu hépatique ont été homogénéisés dans un homogénéisateur Potter-Elehmjerm dans 6 volumes de tampon homogénéisation (10mM HEPES, pH 7,6, 25mM KCl, 2M sucrose, 10% v/v glycérol, 1mM DTT). L'homogénat était délicatement déposé sur un volume de 40% du volume total en tampon, et centrifugé à 79 000 g/4°C/30min. Les noyaux précipités ont été

prélevés et dilués dans 833 μ L de tampon de lyse (25mM Hepes, pH 7,9, 100mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$, 25% v/v glycérol, 1mM DTT), et 167 μ L de 1.2mM KCl ont été ajoutés. Les échantillons étaient incubés 30min à 4C° et centrifugés à 75000g/4°C/30min. Le surnageant était récupéré et 300mg de $(NH_4)_2SO_4$ ont été ajoutés. Les échantillons étaient incubés sous agitation pendant 45 min à 4C° pour permettre la précipitation des protéines. Ils étaient ensuite centrifugés à 110000g/4°C/30min. Le culot était suspendu dans 250 μ L de tampon de dialyse (25mM Hepes, pH 7,6, 40mM KCl, 10% v/v glycérol, 1mM DTT) et les protéines étaient filtrées dans un filtre de centrifugation 100 kDa, car TET possède une masse moléculaire entre 180 et 230 kDa.

L'activité de TET était mesurée avec un kit d'ELISA (#P-3086, Epigentek, Farmingdale, NY, É.-U.) mesurant la 5-hydroxyméthyl-cytosine générée dans la réaction de déméthylation d'ADN.

Résultat

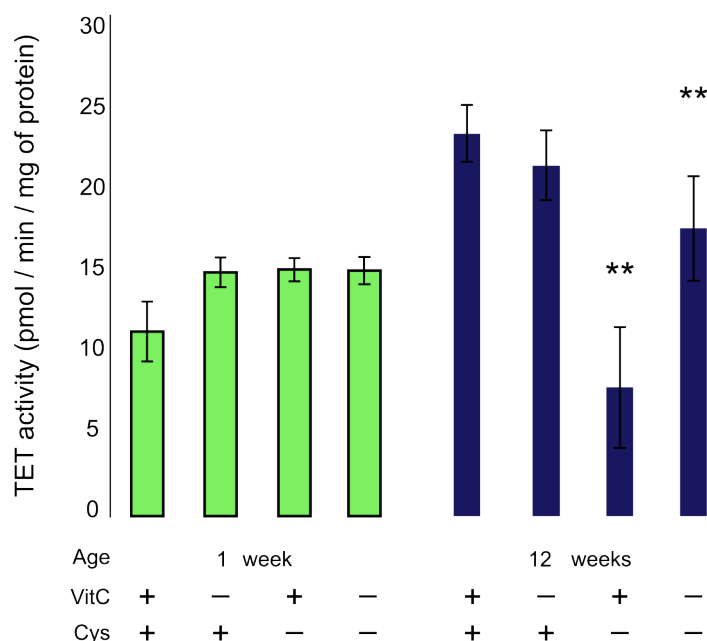


Figure 13 Activité de TET au foie des animaux déficients en vitamine C et cystéine.

** : $p < 0.01$.

Aucune différence significative n'a été observé pour l'activité de TET à 1 semaine de vie. Néanmoins, une diminution de son activité à 12 semaines chez les animaux ayant reçu une déficience en cystéine en début de vie a été observé ($F_{Cys(1,24)}=12.1$; $p < 0.01$)

Expression des gènes du métabolisme énergétique

Méthode

L'expression des gènes du métabolisme énergétique a été mesurée par la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). Trente milligrammes de tissu hépatique ont été homogénéisés et l'ARN a été extrait avec un kit commercial (#80224, Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada). Ensuite, l'ARN a été traité avec la DNase I (#EN0525, ThermoFisher Scientific, Mississauga, ON, Canada), et la transcriptase reverse (#1725038, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) afin de convertir l'information de l'ARN en ADN. La qPCR a été réalisé avec une polymérase commerciale (#1725121, Bio-rad). Les amorces d'ADN ont été testées préalablement, et une efficacité de $100 \pm 10\%$ était accepté. Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 3 Liste des amorces et leurs concentrations utilisées aux réactions de qPCR

Gène	Protéine	Amorce	Séquence	Concentration (nM)
Pfk1	Phosphofruktokinase-1, foie	Forward	CCAGAGCTGCCATCCTCAC	300
		Reverse	CACCTGCACACACTCCATGA	
Acaca	Acétyl-CoA-carboxylase	Forward	TCGCCATAACCAAGTAGAGTCT	300
		Reverse	CCAGAGCTGCCATCCTCAC	
Gkr	Protéine régulatrice de la glucokinase	Forward	GGCCCACAGTTCACCTTCT	325
		Reverse	CCTGGATGCTGCTGGTCTT	
Pfkfb2	Phosphofruktokinase-2/fructose-2,6-biphosphatase	Forward	CACGGAGAGAGCGAGTTCAA	400
		Reverse	CTTCCACTGCTCGTAGGTCA	
Prkaa	Protéine Kinase active par AMP (AMPK), domaine catalyseur	Forward	GGTAATCAGCACTCCAACAGAC	300
		Reverse	TGACAATAATCCACAGCAGACAG	
Pp2ca	Protéine phosphatase 2A (PP2A)	Forward	CGCATCACTATTCTCCGAGGG	400
		Reverse	GAGAGGCCACCATGTAGACAG	
Mlxipl	Carbohydate-responsive element-binding protein (ChREBP)	Forward	TCATCACCACACAGCGACTC	450
		Reverse	ATCTTGTCCCGGCACAGC	
Srebf1		Forward	GCTCCTGACGACCATGAAGA	300

	Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c)	Reverse	TGATGGGCAGTTTGTTCAGCA	
Ppargc1a	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α)	Forward	AGCTTTCTGGGTGGACTCAAG	400
		Reverse	GTCAGTGCCTCAAATGAGGG	
Vcl	Vinculin (VCL)	Forward	ACCACAACCTCCCATCAAGCT	500
		Reverse	ACCACAACCTCCCATCAAGCT	

Résultats

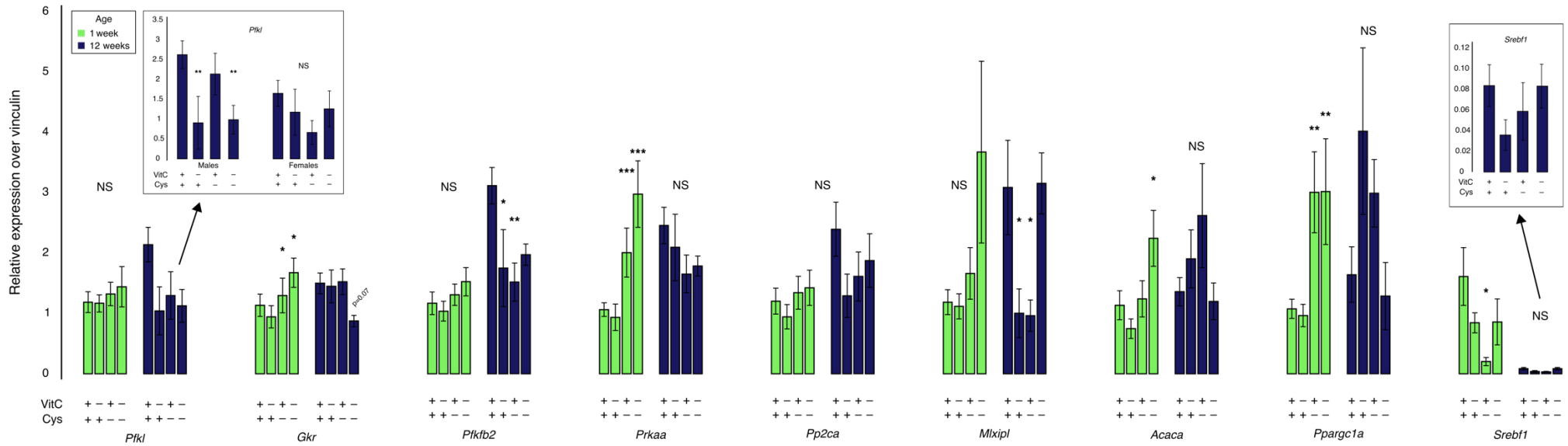


Figure 14 Expression relative des gènes du métabolisme énergétique chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.

* : p<0.05; ** : p<0.01; *** : p<0.001.

À une semaine de vie la déficience en vitamine C n'a mené à aucune différence significative d'expression des gènes évalués ($F_{\text{VitC}(1,23)} \leq 1.328$). La déficience en cystéine a augmenté les niveaux d'ARNm (ARN messenger) des gènes de la *Gkr*, *Prkaa*, *Ppargc1a*, ($F_{\text{Cys}(1,23)} \geq 4.8$; $p < 0.05$) et elle a diminué les niveaux d'ARNm du gène *Srebf1* ($F_{\text{Cys}(1,23)} = 4.5$; $p < 0.05$). Une interaction entre les deux déficiences a été observée sur l'expression de *Acaca* ($F_{\text{VitC}*\text{Cys}(1,23)} \geq 4.8$; $p < 0.05$). Le test *post-hoc* de Dunnett a détecté une augmentation de l'expression d'*Acaca* chez les animaux double déficients ($p < 0.05$). Aucun effet sur l'expression de la *Pfkl*, *Pfkfb2*, *Pp2ca* et *Mlxipl* n'a été observés.

À 12 semaines de vie, la diète néonatale déficiente en vitamine C a diminué l'expression de la *Pfkl* chez les mâles ($F_{\text{Cys}(1,11)} = 10.5$; $p < 0.01$), mais pas chez les femelles ($F_{\text{Cys}(1,12)} = 0.08$). Les deux déficiences ont diminué l'expression du *Pfkfb2* et du *Mlxipl* à 12 semaines de vie ($p < 0.05$), mais la double déficience n'a pas été capable de produire le même effet. Aucun effet significatif sur l'expression de la *Gkr*, *Prkaa*, *Pp2ca*, *Ppargc1a* et *Srebf1* n'ont été observés. Une interaction entre les deux déficiences et le sexe a été observée pour l'*Acaca* ($F_{\text{VitC}*\text{Cys}*\text{Sexe}(1,23)} = 5.9$; $p < 0.05$). Les analyses stratifiées par sexe et diète néonatal n'avaient pas assez de pouvoir statistique pour démontrer une différence significative.

Conclusions générales de l'objectif 2

L'étude des déficiences nutritionnelles en vitamine C et cystéine démontre :

- 1) La baisse des niveaux protéiques de la glucokinase et de la PFK-1 observées chez les animaux NP à 1 semaine de vie peut être expliquée par les déficiences nutritionnelles en vitamine C et glutathion présentes dans la NP. La baisse des niveaux d'ACC chez ses animaux est expliquée par la déficience en glutathion seulement.
- 2) Les niveaux de GSH et les niveaux protéiques de l'ACC à 12 semaines de vie au foie sont aussi expliqués par une compensation des déficiences. Le GSH est diminué chez les animaux ayant reçu une diète déficiente en vitamine C, et augmenté par la déficience néonatale en glutathion. Également, les niveaux protéiques de l'ACC sont diminués par les peroxydes infusés en âge néonatale et augmenté par les déficiences. Ces compensations résultent à ce que ces paramètres ne soient pas affectés par la nutrition parentérale totale;

- 3) Les niveaux de GSH hépatique à 1 semaine de vie, ainsi que l'activité de l'ACC et les niveaux protéiques de la glucokinase et de la PFK-1 ne sont pas expliqués ni par les peroxydes, ni par les déficiences.
- 4) Les niveaux protéiques de la PFK-1 et de l'ACC ne concordent pas avec leur expression génique et ils ont des tendances opposées. Il est possible que l'hypométhylation de l'ADN soit à la source de ces discordances.

La suite de cet objectif serait l'approfondissement des études de la méthylation de l'ADN et d'autres mécanismes épigénétiques au foie qui expliqueraient le désaccord entre les niveaux protéiques et l'expression de gènes, ainsi que les effets à long terme observés. Cependant, puisque cette thèse porte aussi sur la caractérisation des effets aux poumons et leur relation avec le métabolisme redox hépatique, l'objectif 3 porte sur les atteintes pulmonaires des déficiences nutritionnelles en vitamine C et cystéine en âge néonatale.

Réponse à l'objectif 3 - Disturbances of the lung glutathione system in adult guinea pigs following neonatal vitamin C or cysteine deficiency

Disturbances of the lung glutathione system in adult guinea pigs following neonatal vitamin C or cysteine deficiency

Published on [Antioxidants](#).

Vitor Teixeira¹, Ibrahim Mohamed² and Jean-Claude Lavoie^{1,2*}

¹Department of Nutrition, University of Montreal, and CHU-Sainte-Justine Research Centre, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada;

²Department of Pediatrics-Neonatology, CHU Sainte-Justine, University of Montreal, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada;

Contribution

- Teixeira V (70%) : conceptualisation, methodology, investigation, formal analysis, writing of original draft.
- Mohamed I (10%) : funding acquisition, reviewing and editing of manuscript.
- Lavoie JC (20%) : conceptualisation, investigation, project administration, formal analysis, reviewing and editing of manuscript, funding acquisition.

*Corresponding author :

Received: 6 June 2023

Jean-Claude Lavoie, PhD,

Revised: 26 June 2023

Research Centre, CHU Sainte-Justine,

Accepted : 26 June 2023

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine,

Published : 29 June 2023

Montreal, QC, H3T 1C5, Canada.

Email: jean-claude.lavoie@umontreal.ca

Abstract

In premature infants receiving parenteral nutrition, oxidative stress is a trigger for the development of bronchopulmonary dysplasia, which is an important factor in the development of adult lung diseases. Neonatal vitamin C and glutathione deficiency is suspected to induce permanent modification of redox metabolism favoring the development of neonatal and adult lung diseases. Sixty-four 3-day-old guinea pigs were fed an oral diet that was either complete or deficient in vitamin C (VCD), cysteine (CD) (glutathione-limiting substrate) or both (DD) for 4 days. At 1 week of age, half of the animals were sacrificed while the other started a complete diet until 12 weeks of age. At 1 week, the decrease in lung GSH in all deficient groups is partially explained by the oxidation of liver methionine-adenosyltransferase (MAT). mRNA levels of kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), glutathione-reductase (Gsr) and glutaredoxin-1 (Glrx) were significantly lower only in CD, but not in DD. At 12 weeks GSH and GSSG were increased in VCD while GSSG and Keap1, Gsr and Glrx mRNA were increased in CD. Both deficiencies result in a long-term change in glutathione metabolism. CD led to a long-term deregulation of the glutathionylation cycle, favoring glutathionylation status at 1 week, and deglutathionylation at 12 weeks.

Keywords: Thrifty phenotype hypothesis; Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD); lungs; bronchopulmonary dysplasia; glutathione; glutathionylation; glutaredoxin; glutathione reductase; lung disease; antioxidant deficiencies.

1. Introduction

Very premature birth (≤ 32 weeks of gestation) is associated with several short- and long-term consequences over the development of several diseases. In neonatal life, infants born prematurely develop complications such as bronchopulmonary dysplasia [1], and they are at higher risk of developing asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and other respiratory complications in adulthood [2,3], as well as other complications [1,2,4–11]. Despite the strong clinical evidence, it is challenging to seize what specific aspects of prematurity lead to the increased risk of neonatal and adult diseases. Because oxidative stress is a common feature of these neonatal and adult pulmonary diseases [4,12], the development of a permanent disruption of redox metabolism is suspected.

Besides early birth, at the time when organ development is underway, premature neonates are submitted to several medical interventions. One of them is parenteral nutrition. This mode of nutrition is administered to preterm neonates due to their intestinal immaturity. It is composed of mono- and oligomeric nutrients diluted in a solution that is infused intravenously. Because these nutrients are dissolved in the same solution, they can interact with each other. For instance, photo-excited riboflavin will interact with vitamin C and degrade the latter while also generating peroxides [13–15]. In fact, after 5h of light exposure, half of vitamin C added to parenteral nutrition solution is degraded, and after 24h, no vitamin C is found in the solution [13]. The pulmonary concentration of vitamin C is reduced in animals infused with parenteral nutrition devoid of photoprotection [16]. On the other hand, peroxides contaminating parenteral nutrition solutions inhibit glutathione synthesis by decreasing the conversion of methionine into cysteine [17,18], the limiting substrate for glutathione synthesis [19,20]. Thus, neonates receiving parenteral nutrition are at risk of low vitamin C intakes and low glutathione synthesis. These two molecules are important cellular antioxidants.

We have demonstrated that vitamin C and cysteine deficiencies lead to higher cytoplasmic Nrf2 in the neonatal liver of guinea pigs with decreased translocation of Nrf2 into the nucleus at adult life [7]. Nrf2 is the master regulator of the antioxidant response, therefore, it is hypothesized that vitamin C and cysteine deficiencies lead to long-term effects on redox metabolism. These long-term effects could be due to the epigenetic programming induced by oxidative stress, as it has been demonstrated that it can induce DNA and histone hypermethylation and histone hypoacetylation

[21,22]. We aimed to validate the effect of these neonatal deficiencies, independently of other parenteral nutrition components, over redox metabolism in adult guinea pigs' lungs. We evaluated glutathione levels as well as the mRNA and protein levels of some key redox metabolism proteins. We hypothesized that an oxidative stress in neonatal life would lead to an increase in antioxidant defenses at adulthood in guinea pigs.

Results confirm the strong impact of neonatal diets deficient in vitamin C and cysteine on redox metabolism. Compared to control animals, pulmonary glutathione was lower at the time of deficiencies (at one week of age), and higher 11 weeks after stopping the deficient diets. The cysteine-deficient diet induced a decrease in Keap1, Gsr and Glrx mRNA levels at one week of life, whereas they were higher at 12 weeks, which is accompanied by a long-term decrease in deglutathionylation enzymes, such as glutaredoxin and glutathione-reductase. Although males and females were used in this study, sex was not found to be a contributing factor to the assessed outcomes.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental procedures

Briefly, 3-day-old Hartley guinea pigs (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) from both sexes were randomized into 4 groups (n=8 males and 8 females per group) according to the diet given between day 3 and day 7 of life : 1) Complete diet (Control); 2) Vitamin C free diet (Vitamin C deficient – VCD); 3) Cysteine free diet (Cysteine deficient diet – CD); 4) Vitamin C and Cysteine deficient diet (double deficient – DD). After 4 days of receiving the aforementioned diets, half of the animals in each group were sacrificed (1-week-old animals) and the other half were transitioned into a complete standard guinea pig diet (2041-Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet; Harlan, Montréal, QC, Canada), until the age of 12 weeks. All sacrifices were performed under isoflurane anesthesia, and 12-week-old animal sacrifices were performed after a 16h fasting period. During sacrifice, lungs and liver were collected and quickly frozen at -80°C and kept at this temperature until biochemical determinations. The study experimental design, including diet composition, has been published before [7].

All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, and the study protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of the CHU-Sainte-Justine Research Centre (protocol #739).

2.2. Biochemical assessments

2.2.1. GSH, GSSG and Ascorbate

Two hundred fifty milligram of lung tissue were homogenized in 5 volumes of 5% (w/v) metaphosphoric acid and centrifuged at 7200g/3 min. The supernatant was conserved at -80°C and the pellet was used for protein quantification by the Bradford method [23]. GSH and GSSG were resolved in a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) in a boric acid 75mM pH 8.4, bis-tris 25mM buffer. Separation was performed in a 75µm/50cm silica capillary, 28°C, 18kV, and absorbance was measured at 200nm [24–26]. Ascorbate was resolved in a 50µM/45cm silica capillary, 25°C, 30kV in an Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Separation was performed in boric acid 200 mM and acetonitrile 20% v/v buffer, pH 9.6 and detection of ascorbate was performed by absorbance at 268nm [7,21].

2.2.2. RT-qPCR

In lung tissue, the expression of genes involved in redox metabolism was measured by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction. Thirty milligrams of lungs were homogenized, and RNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (#80224, Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada). To avoid interference from genomic DNA, RNA was treated with DNase I (#EN0525, ThermoFisher Scientific, Mississauga, ON, Canada), followed by reverse transcriptase treatment (#1725038, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Finally, qPCR was performed with iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (#1725121, Bio-rad). Primers pairs were previously tested for guinea pig genes, and efficiency was accepted at 100±10%. The primers used and their concentrations are described in table 1.

2.2.3. Keap1, GR and GRX protein levels

Fifty to one hundred milligrams of lung tissue were homogenized in 9 volumes of buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM and EDTA 5 mM) and centrifuged at 1 300 g for 30s at room temperature. The supernatant was collected, the protein concentration was measured, and the aliquots were stored at -80 °C. For the measurement of Keap1 and GR, 30µg of protein were used, and for GRX, 50µg were used. The samples were properly diluted in Laemmli's buffer, and the proteins were denaturated at 95 °C for 5 min. The proteins were resolved in a 4/12% acrylamide gel at 110 V for 150 min (Keap1 and GR) or 120 min (GRX) and then transferred to a PVDF

membrane. The membranes were blocked with skim milk 5% diluted in PBS-Tween 20 0.2% and they were incubated with primary antibodies overnight. The antibodies used were the following: Keap1: mouse anti-human KEAP1 monoclonal antibody (1F10B6, ThermoFisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada) (1:1000); GR: mouse anti-human glutathione-reductase monoclonal antibody (sc-133245, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:1000); and GRX: rabbit anti-human glutaredoxin 1 polyclonal antibody (ab45953, Abcam Plc, ON, Canada) (1:250); the membranes were washed in PBS-Tween 20 0.05% and incubated for 1h, room temperature with goat anti-mouse IgG-HRP antibody (HAF007, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (1:2500) for GR and Keap1 membranes, or goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (W4011, Promega, Madison, WI, USA) (1:2500) for GRX membranes. The proteins were detected by chemiluminescence.

2.2.4. Biotin Switch and Methionine adenosyltransferase (MAT) oxidation

The method of Jaffrey was used, with some modifications [27]. One hundred milligrams of frozen liver were homogenized in 10 volumes of HEN buffer (Hepes-Na 250mM pH 7.7, EDTA 1mM, neocuproine 0.1mM) and centrifuged at 2 000g/10 min/4°C. The supernatant was separated and 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) was added to a final concentration of 0.4%. Three hundred microliters of this sample were diluted in 4 volumes of HENSM buffer (HEN buffer + SDS 2.5% and 20mM methyl methanethiosulfonate (MMTS)) and incubated at 50°C/20min under continuous agitation. MMTS was removed from samples by protein filtering in centrifugal 3 kDa protein filtering units, and samples were washed twice with HENS buffer (HEN buffer + SDS 1%). Samples were incubated with 50µL of tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 50mM for 1h/RT and had the TCEP removed by centrifugal filtering like the previous step. Reduced cysteines were probed with biotin through incubation of samples with 120µL of 5-[(3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxo-1,3,3*a*,4,6,6*a*-hexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]-*N*-[6-[3-(pyridin-2-yl)disulfanyl]propanoylamino]hexyl]pentanamide (biotin-HPDP) 4mM in dimethylformamide (DMF) and incubated for 1h/RT. Biotin-HPDP was removed by centrifugal filtering with two washes in HENS buffer. One hundred microliters of the biotinylated sample were diluted in 200µL of neutralisation buffer (Hepes-Na 20mM pH 7.7, NaCl 100mM, EDTA 1mM, Triton X-100 0.5%) and 10µL of streptavidin-agarose resin beads were added. Samples were incubated for 1h/RT. The beads were washed with 500µL of neutralisation buffer plus NaCl

600mM, and centrifuged at 1 400g/5s/RT. The supernatant was discarded, and the wash was repeated 4 other times. Protein elution was performed by the addition of 100µL of elution buffer (Hepes-Na 20mM pH 7.7, NaCl 100mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoethanol 100mM), and 10min incubation at RT. Samples were centrifuged at 1 400 g/1min/RT and the supernatant was conserved at -80°C. Unpurified biotinylated (total proteins) and purified biotinylated samples (oxidized proteins) were submitted to Western blotting. Ten micrograms of total proteins and 45µL of the purified oxidized proteins in 5µL of loader buffer were denaturated at 95°C/5min and resolved in a 4/12% gel as previously published for acetyl-CoA carboxylase protein [7,25]. MAT was detected with mouse anti-human MAT Ia/IIa monoclonal antibody (sc-166452, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:1000) for 1h/room temperature, followed by goat anti-mouse IgG-HRP antibody HAF007 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (1:2500) for 1h/room temperature. Antibodies were diluted in 2.5% w/v skim milk in phosphate-buffer-saline-Tween-20.

2.2.5. Statistics

All data are presented as mean \pm S.E.M. Data from the four groups were orthogonally compared by 3-way-ANOVA, considering vitamin C, cysteine, and sex as contributing factors. An absence of significant interactions between vitamin C and cysteine was interpreted as independent effects, while a significant interaction as observed for GSH, ascorbate and MAT, was interpreted as reaching a plateau. When a significant interaction between vitamin C and cysteine was observed, we performed a Dunnett's post hoc test. This test compares the control group against all other groups. The significance threshold was set at $p = 0.05$.

3. Results

Bodyweight, growth and other baseline characteristics of these animals have been described before [7]. Briefly, all animals had similar bodyweights at baseline, and while controls and VCD had $10\pm 3\%$ and $7\pm 1\%$ weight gain during the 4 days of experimental diets, CD and DD groups did not gain weight ($-3\pm 1\%$ and $-6\pm 1\%$, respectively). Lung weight per body weight (Figure 1) was higher in all deficient animals at 1 week of age ($p < 0.05$) from both sexes (Figure 1). However, this effect seems to be caused by the variations in bodyweight in these animals [7], as no differences in lung weight itself are observed among groups ($F_{(1,23)}=0.32$, $p=0.940$) at one week of age. At 12 weeks, lung weight per bodyweight was not different among groups, but it was higher in females ($F_{\text{Sex}(1,24)}=25.8$; $p < 0.001$). However, an interaction between cysteine deficiency and sex was

observed ($F_{Cys*sex(1,24)}=5.0$, $p<0.05$). While cysteine deficiency decreases lung weight per body weight in 12-week-old males, it increases it in females. No other effects of sex were statistically significant for the other variables neither at 1 week ($F_{Sex(1,23)}\leq 3.1$), nor at 12 weeks ($F_{Sex(1,24)}\leq 2.8$), therefore all the following results represent both male and female animals together.

3.1. Lung GSH and GSSG levels, and redox potential

At neonatal age, GSH was decreased by -34% in all deficient groups, compared to the control (Figure 2A). Double deficient animals did not have a further decrease ($F_{VC \times Cys(1,23)}=12.4$, $p<0.01$). Dunnet's post-hoc analysis showed that all groups have a similar decrease (VCD: -37%, CD: -34%; DD: -31%; $p<0.01$). GSSG, on the other hand was only decreased in cysteine deficient animals ($F_{Cys(1,23)}=12.6$, $p<0.01$), suggesting a decrease in total glutathione with no redox imbalance (Figure 2B). This is confirmed by the redox potential of glutathione that is only oxidized in vitamin C deficient animals (VCD: +11.3mV; $p<0.05$), and not in cysteine deficient animals (CD: + 3.6 mV; $p=0.996$) (Figure 2C).

At 12 weeks of age, GSH and GSSG were increased in all animals submitted to a deficiency early in life (Figure 2A and 2B). However, the effects were additive for GSSG ($F_{VC(1,24)}=24.4$, $p<0.001$; $F_{Cys(1,24)}=9.0$, $p<0.01$), but not for GSH, as evidenced by the significant interaction ($F_{VC \times Cys(1,24)}=4.6$, $p<0.05$), and the significant effects when the DD group is not included in the analysis ($F_{VC(1,18)}=10$, $p<0.01$; $F_{Cys(1,18)}=4.9$, $p<0.05$). No differences in redox potential were observed ($F_{(1,24)}=0.8$) (Figure 2C).

3.2. Pulmonary Ascorbate

At 1 week of age, both vitamin C and cysteine deficiencies decreased lung ascorbate ($F_{VC(1,23)}=4.8$, $p<0.05$; $F_{Cys(1,23)}=10.8$, $p<0.01$). A further decrease was not observed in the DD group. No differences are observed at 12 weeks of age (Figure 2D).

3.3. Lung gene expression

No statistical differences were observed in the expression of Nfe2l2, Gclc or Gclm (Figure 3). However, a significant positive correlation between Nfe2l2 and Gclc expression is observed ($Gclc\ mRNA=1.0362 \cdot (Nfe2l2\ mRNA)+0.123$; $r^2=0.59$; $p<0.001$), confirming the role of Nrf2 in inducing GCLC expression. A similar correlation is also observed for Nfe2l2 and Gclm, suggesting Nrf2 plays a role in GCLM expression. However, according to the r^2 value, Nrf2 does not seem to

be the preponderant factor in Gclm expression, as it only contributes to 16% of the variation observed in the Gclm data ($Gclm\ mRNA=0.91 \cdot (Nfe212\ mRNA)+0.51$; $r^2=0.16$; $p<0.01$).

Neonatal cysteine deficiency led to a decrease in mRNA levels of Keap1, Gsr and Glrx ($p<0.05$) at one week of life, while an increase in their gene expression was observed at 12 weeks of age ($p<0.05$) (Figure 3). The expression of these genes was highly and positively correlated (Figure 4). Vitamin C deficiency did not significantly affect the expression of any of the assessed genes.

3.4. Protein levels of Keap1, GR and GRX

At one week of life, no significant changes were observed for Keap1, GR or GRX protein levels ($F_{(1,23)} < 3.4$). At 12 weeks of life, no significant differences were observed for Keap1 protein levels ($F_{(1,24)} < 3.0$). A significant decrease in GR protein levels were observed in all experimental groups. An interaction between vitamin C and cysteine deficiencies is also observed ($F_{VC \times Cys (1,24)} = 6.8$, $p < 0.05$), and Dunnett's post-hoc test revealed each of the groups having received a deficient diet during neonatal life had significantly lower GR levels ($p<0.05$). A similar decrease was also observed in GRX protein levels in cysteine deficient groups at 12 weeks of life ($F_{Cys (1,17)} = 5.1$, $p < 0.05$).

3.5. Hepatic methionine-adenosyltransferase (MAT) oxidation

At one week of life, liver MAT was significantly more oxidized in all deficient groups compared to the control (Figure 6A). Following a significant interaction between vitamin C and cysteine deficiencies ($F_{VC \times Cys (1,23)}=22.4$, $p<0.001$), Dunnett's test showed all groups presented a significant increase in MAT oxidation ($p<0.001$). At 12 weeks of life, there was no difference between groups, and MAT oxidation was similar to that seen in deficient one-week-old animals (Figure 6A). A significant negative linear correlation was observed between lung GSH and oxidized MAT in liver for 1 week-old animals ($Lung\ GSH=(-3.38 \cdot MAT_{Oxidized/Total}) + 15.21$; $r^2= 0.381$; $p<0.001$). This relationship was not significant in the 12-week animals ($Lung\ GSH=(0.96 \cdot MAT_{Oxidized/Total}) + 45.76$; $r^2= 0.002$; $p=0.80$)(Figure 6B).

4. Discussion

The study supports the hypothesis by demonstrating that a diet deficient in antioxidants during the neonatal period can induce a long-term modification of redox metabolism in lungs. Diets deficient in vitamin C or cysteine, independently of each other, caused a drop in glutathione levels during

the duration of these diets and an increase 11 weeks after cessation of these diets (12 weeks of life). However, only cysteine deficiency modulated gene transcription of *Keap1*, *Gsr*, and *Glx*; lower than the control at one week of age and higher at 12 weeks – while also modulating the long-term protein levels of GR and GRX.

The study also demonstrates the reliance of lung glutathione levels and redox metabolism on the oxidation status of liver MAT, an enzyme needed for glutathione synthesis (Figure 7). This hepatic metabolism is highly affected by vitamin C and cysteine deficiencies. This is one of the few studies to demonstrate the interorgan effect of protein oxidation over redox metabolism and the only one, to our knowledge, to demonstrate it following neonatal deficiencies in vitamin C or in cysteine. This relationship has been demonstrated for liver MAT activity and plasma GSH levels [17], but not liver MAT and lung GSH.

Interestingly, vitamin C and cysteine deficiencies have different effects. Therefore, we cannot attribute these consequences solely to their effect on decreased GSH levels. At one week of life, vitamin C deficiency leads to a decrease in lung GSH and ascorbate, an oxidation of redox potential of glutathione and the oxidation of liver MAT. The decrease in lung ascorbate levels illustrates the physiological deficiency caused by the diet. The same decrease was already observed before in liver and in other similar animal models [7,24,28]. Given that ascorbate can reduce S-nitrosylated cysteines [27,29] and sulfenic acid protein adducts [30], and that MAT can be inactivated by these posttranslational modifications [18,31,32], it is likely that any oxidation of cysteine residues in MAT will remain oxidized as ascorbate levels are not enough to reduce them. Oxidized MAT leads to lower availability of cysteine for glutathione synthesis in liver. Since the lungs are dependent on liver glutathione synthesis [33–35], the lower hepatic synthesis leads to lower lung GSH (Figure 7).

On the other hand, neonatal cysteine deficiency leads to a decrease in total glutathione (GSH and GSSG) and ascorbate levels. Cysteine is the limiting substrate in GSH synthesis [19,20]; therefore, it was expected to observe a decrease in GSH and GSSG levels. However, no changes in redox potential were observed in the CD group. Simultaneously, we also observe a decrease in *Keap1*, *Gsr* and *Glx* mRNA levels. Unfortunately, our experimental design could not demonstrate a significant relationship between Nrf2 and in *Gclm* or *Gclc* expression, two Nrf2 targets [36]. *Gsr* codes for glutathione-disulfide reductase, and *Glx* for glutaredoxin. These enzymes work together

to deglutathionylate cysteinyl residues in proteins. First, glutaredoxin deglutathionylates proteins while forming an internal disulfide in its active site. Afterwards, two molecules of GSH reduce this disulfide, generating GSSG, which in turn is reduced back to GSH by glutathione reductase [37]. Therefore, it is logical that the expression of these genes is regulated similarly. Indeed, the expression of these genes is likely to be regulated by the same mechanism in our model, given the strong positive correlation between them. However, no significant changes in the protein levels of these proteins were observed at 1 week of age. This result represents a dissociation between gene expression and protein translation, and it could be due to oxidative signals that affect epigenetic mechanisms. Indeed, it has been demonstrated that oxidative stress increases DNA methylation [21,22]. It is possible that the lack of glutathione decreases the expression of these genes through epigenetic mechanisms, but the changes in protein levels. Would exposure for more than 4 days have induced a change in protein levels?

At 12 weeks of age no changes in MAT oxidation are observed in animals in vitamin C deficiency groups. However, lung GSH and GSSG levels were 24% and 74% higher, respectively. This seems to be an adaptive response to increase total glutathione following lower glutathione at earlier life. In CD and DD groups at 12 weeks of age, an increase in GSH and GSSG is observed, much like that caused by early life vitamin C deficiency. However, cysteine deficiency seems to lead to additional effects, as it raises *Keap1*, *Gsr* and *Glrx* mRNA levels. These effects are the opposite from those observed at 1 week, which appears to be a possible compensatory long-term effect to regulate redox metabolism. Indeed, this increase in mRNA levels could be tentative to reach homeostasis by increasing the protein levels of these proteins that has been decreased. Given that GSH is a co-substrate of GRX in protein disulfide reduction, an increase in GSH concentration could also be a compensatory mechanism to support GRX activity. The decreased levels of GR and GRX could increase glutathionylation levels in adult lungs. Protein glutathionylation in lungs is associated with airway inflammation and fibrosis, while glutaredoxin seems to be beneficial in ablating inflammatory responses triggered by asthma initiators [38–40]. It is therefore possible that these long-term effects of cysteine deficiency – and to a lesser extent, vitamin C deficiency – in the neonatal period could increase the risk of pulmonary conditions such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Indeed, preterm neonates that go through a neonatal oxidative stress often develop these conditions at adulthood [1–11]. Future studies should focus on the effect of these neonatal deficiencies on the development of chronic lung diseases in adulthood.

The study highlights several limitations in our knowledge of the impact of antioxidant deficiency occurring during the neonatal period. It was expected to observe a decrease in lung ascorbate levels in animals fed a diet deficient in vitamin C. However, a similar observation in cysteine deficiency animals was surprising, and remains unexplained. As for the impact of vitamin C deficiency on the level of GSH and not on GSSG, leading to an oxidation of the redox potential of glutathione, it was unexpected. The metabolic pathway based on MAT oxidation in the liver could be part of the explanation. Knowing that the prevalence of ascorbate deficiency is high in populations [51,52], it becomes very relevant to deepen our knowledge of the metabolic relationship between vitamin C and glutathione. Another limit is the magnitude of the deficiencies. The lack of additive effect of vitamin C and cysteine deficiencies on the levels of GSH and ascorbate observed at one week of life was statistically documented by a significant interaction. The interpretation could be that each deficiency reached a maximum effect, which results in a plateau in doubly deficient animals. This plateau could make it difficult to discriminate the difference in metabolic effects between cysteine and ascorbate deficiency. We also observed that the decreases in the expression of *Gsr* and *Glrx* at 1 week of age in the double deficient group is not as severe as the decrease in single deficient animals. This effect has been observed in other models of long-term effects of early life insults. One particular study tested the combination of the effects of malnutrition during the gestation period with the effects of leptin treatment on the offspring. Leptin, when administered during the neonatal period, reduces consumption and mimics malnutrition. Although gestational malnutrition and leptin have very similar effects in modulating the expression of genes related to energy metabolism, mitochondrial function, and immune response, the combination of the two inhibits this programming [43]. However, the underlying mechanisms are not yet understood. Although the data suggest a lower deglutathionylation activity, this needs to be demonstrated. Unfortunately, the present study does not allow us to do so. Given the importance of this finding, further study should be undertaken to confirm our findings by measuring glutathionylation activity in relation to lung disease.

This is the first study, to our knowledge, to describe the evolution of protein oxidation between neonatal life and early adulthood. In this study, we assessed MAT, which is more reduced early in life in controls. This suggests that neonatal proteins are more susceptible to protein oxidation, which makes early life oxidative stress a very important programming factor. We have already demonstrated the effects of early life oxidative stress over the development of neonatal diseases

[1,4,7,21,26,44,46], while several adult diseases are also associated with protein oxidation [38–40,53–56]. At 12 weeks of age, many of the variables that were decreased early in life are increased in similar proportions at 12 weeks, as a rebound effect. A similar effect is observed in animals and humans who went through protein and energy deficiencies early in life [57–59]. This effect was named “The Thrifty Phenotype Hypothesis” by Baker [60]. This is the first time an effect similar to that described in the thrifty phenotype hypothesis is observed for redox metabolism outcomes, notably GSH, GSSG and the mRNA levels of *Keap1*, *Gsr* and *Glrx*. Studies that induced neonatal vitamin C or glutathione deficiencies have been done, but they have not focused on biochemical parameters [61,62]. Energy metabolism is directly coupled to redox metabolism. GSH/GSSG and NADPH are similar to ATP/ADP and NADH and in both cases, glucose is the main source of energy to generate NAD[P]H. It is possible that the same mechanisms that drive the changes observed in the thrifty phenotype hypothesis, also drive the changes observed in our neonatal antioxidant deficiency model. These include, but are not limited to, perturbations in epigenetics [21,63], organ structure [9,64] and accelerated aging [7,11]. Given how oxidative stress can modulate each of these factors [7,9,21], they are good candidate mechanisms that would explain this effect in our model.

5. Conclusions

We demonstrate in this study the importance of adequate nutrition at neonatal life. Vitamin C and cysteine deficiencies lead to liver MAT oxidation and lung oxidative stress. Cysteine deficiency also modulates the expression of genes involved in deglutathionylation at early life and adulthood, and programs less deglutathionylation at 12 weeks. This mechanism could be the link between neonatal oxidative stress and adult lung diseases.

Supplementary Materials: There is none

Author Contributions: Conceptualization: V.T. and J.-C.L.; Data curation: V.T. and J.-C.L.; Methodology: V.T. and J.-C.L.; Formal Analysis: V.T.; Investigation: V.T.; Writing - Original Draft: V.T. and J.-C.L.; Writing - Review & Editing: I.M.; Visualisation: V.T. and J.-C.L.; Supervision: J.-C.L.; Project administration: J.-C.L.; Funding acquisition: J.-C.L. and I.M.

Funding: This research was funded by the Canadian Institutes of Health Research, grant number PJT-148522.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Comité Institutionnel de Bonne Pratiques Animales en Recherche (Institutional Committee for Good Practice with Animal in Research) of the CHU Sainte-Justine (Protocol code 739, approval on 7 September 2016).

Data Availability Statement: All data is included in the article and supplemental materials.

Acknowledgments: The authors thank Clémence Guiraut for her assistance in animal care and biochemical determinations, as well as the CHU-Sainte-Justine animal care facility staff for the support in leading this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Mohamed, I.; Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Ascorbylperoxide Contaminating Parenteral Nutrition Is Associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Preterm Infants. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 2017, 41, 1023–1029, doi:10.1177/0148607116643704.
2. Bui, D.S.; Perret, J.L.; Walters, E.H.; Lodge, C.J.; Bowatte, G.; Hamilton, G.S.; Thompson, B.R.; Frith, P.; Erbas, B.; Thomas, P.S.; et al. Association between Very to Moderate Preterm Births, Lung Function Deficits, and COPD at Age 53 Years: Analysis of a Prospective Cohort Study. *Lancet Respir. Med.* 2022, 10, 478–484, doi:10.1016/S2213-2600(21)00508-7.
3. Mowitz, M.E.; Gao, W.; Sipsma, H.; Zuckerman, P.; Wong, H.; Ayyagari, R.; Sarda, S.P.; Siffel, C. Long-Term Burden of Respiratory Complications Associated with Extreme Prematurity: An Analysis of US Medicaid Claims. *Pediatr. Neonatol.* 2022, 63, 503–511, doi:10.1016/j.pedneo.2022.05.007.
4. Ozsurekci, Y.; Aykac, K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016, doi:10.1155/2016/2768365.
5. Nuyt, A.M.; Lavoie, J.C.; Mohamed, I.; Paquette, K.; Luu, T.M. Adult Consequences of Extremely Preterm Birth: Cardiovascular and Metabolic Diseases Risk Factors, Mechanisms, and Prevention Avenues. *Clin. Perinatol.* 2017, 44, 315–332, doi:10.1016/j.clp.2017.01.010.
6. Breijl, L.M.; Kerkhof, G.F.; Hokken-Koelega, A.C.S. Risk for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Young Adults Born Preterm. *Horm. Res. Paediatr.* 2015, 84, 199–205, doi:10.1159/000437054.
7. Teixeira, V.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Neonatal Vitamin C and Cysteine Deficiencies Program Adult Hepatic Glutathione and Specific Activities of Glucokinase, Phosphofructokinase, and Acetyl-CoA Carboxylase in Guinea Pigs' Livers. *Antioxidants* 2021, 10, 953, doi:10.3390/antiox10060953.
8. Parkinson, J.R.C.; Hyde, M.J.; Gale, C.; Santhakumaran, S.; Modi, N. Preterm Birth and the Metabolic Syndrome in Adult Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatrics* 2013, 131, doi:10.1542/peds.2012-2177.
9. Ravizzoni Dartora, D.; Flahault, A.; Pontes, C.N.R.; He, Y.; Deprez, A.; Cloutier, A.; Cagnone, G.; Gaub, P.; Altit, G.; Bigras, J.-L.; et al. Cardiac Left Ventricle Mitochondrial

Dysfunction After Neonatal Exposure to Hyperoxia: Relevance for Cardiomyopathy After Preterm Birth. *Hypertension* 2021, 1–13, doi:10.1161/hypertensionaha.121.17979.

10. Flahault, A.; Paquette, K.; Fernandes, R.O.; Delfrate, J.; Cloutier, A.; Henderson, M.; Lavoie, J.-C.; Mâsse, B.; Nuyt, A.M.; Luu, T.M.; et al. Increased Incidence but Lack of Association Between Cardiovascular Risk Factors in Adults Born Preterm. *Hypertension* 2020, 1–10, doi:10.1161/hypertensionaha.119.14335.

11. Parkinson, J.R.C.; Emsley, R.; Adkins, J.L.T.; Longford, N.; Ozanne, S.E.; Holmes, E.; Modi, N. Clinical and Molecular Evidence of Accelerated Ageing Following Very Preterm Birth. *Pediatr. Res.* 2020, 87, 1005–1010, doi:10.1038/s41390-019-0709-9.

12. Kirkham, P.A.; Barnes, P.J. Oxidative Stress in COPD. *Chest* 2013, 144, 266–273, doi:10.1378/chest.12-2664.

13. Knafo, L.; Chessex, P.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Association between Hydrogen Peroxide-Dependent Byproducts of Ascorbic Acid and Increased Hepatic Acetyl-CoA Carboxylase Activity. *Clin. Chem.* 2005, 51, 1462–1471, doi:10.1373/clinchem.2005.050427.

14. Laborie, S.; Lavoie, J.C.; Chessex, P. Increased Urinary Peroxides in Newborn Infants Receiving Parenteral Nutrition Exposed to Light. *J. Pediatr.* 2000, 136, 628–632, doi:10.1067/mpd.2000.105131.

15. Laborie, S.; Lavoie, J.-C.; Pineault, M.; Chessex, P. Contribution of Multivitamins, Air, and Light in the Generation of Peroxides in Adult and Neonatal Parenteral Nutrition Solutions. *Ann. Pharmacother.* 2000, 34, 440–445, doi:10.1345/aph.19182.

16. Lavoie, J.C.; Rouleau, T.; Tsopmo, A.; Friel, J.; Chessex, P. Influence of Lung Oxidant and Antioxidant Status on Alveolarization: Role of Light-Exposed Total Parenteral Nutrition. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 572–577, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.018.

17. Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Inhibition of Hepatic Methionine Adenosyltransferase by Peroxides Contaminating Parenteral Nutrition Leads to a Lower Level of Glutathione in Newborn Guinea Pigs. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, 53, 2250–2255, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.541.

18. Pajares, M.A.; Durán, C.; Corrales, F.; Pliego, M.M.; Mato, J.M. Modulation of Rat Liver S-Adenosylmethionine Synthetase Activity by Glutathione. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 17598–17605, doi:10.13039/501100004587.
19. Beatty, P.; Reed, D.J. Influence of Cysteine upon the Glutathione Status of Isolated Rat Hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1981, 30, 1227–1230, doi:10.1016/0006-2952(81)90302-6.
20. Lavoie, J.C.; Rouleau, T.; Truttman, A.C.; Chessex, P. Postnatal Gender-Dependent Maturation of Cellular Cysteine Uptake. *Free Radic. Res.* 2002, 36, 811–817, doi:10.1080/1071576021000005230.
21. Mungala Lengo, A.; Guiraut, C.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Relationship between Redox Potential of Glutathione and DNA Methylation Level in Liver of Newborn Guinea Pigs. *Epigenetics* 2020, 1–13, doi:10.1080/15592294.2020.1781024.
22. Niu, Y.; Desmarais, T.L.; Tong, Z.; Yao, Y.; Costa, M. Oxidative Stress Alters Global Histone Modification and DNA Methylation. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 82, 22–28, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.028.
23. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
24. Turcot, V.; Rouleau, T.; Tsopmo, A.; Germain, N.; Potvin, L.; Nuyt, A.M.; Lavoie, J.C. Long-Term Impact of an Antioxidant-Deficient Neonatal Diet on Lipid and Glucose Metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, 47, 275–282, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.026.
25. Maghdessian, R.; Côté, F.; Rouleau, T.; Ouadda, A.B.D.; Levy, É.; Lavoie, J.C. Ascorbylperoxide Contaminating Parenteral Nutrition Perturbs the Lipid Metabolism in Newborn Guinea Pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010, 334, 278–284, doi:10.1124/jpet.110.166223.
26. Teixeira, V.; Guiraut, C.; Mohamed, I.; Lavoie, J.-C. Neonatal Parenteral Nutrition Affects the Metabolic Flow of Glucose in Newborn and Adult Male Hartley Guinea Pigs' Liver. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2021, 12, 484–495, doi:10.1017/S2040174420000719.
27. Jaffrey, S.R.; Snyder, S.H. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Sci. STKE* 2001, 2001, doi:10.1126/stke.2001.86.pl1.

28. Lavoie, J.C.; Chessex, P.; Rouleau, T.; Tsopmo, A.; Friel, J. Shielding Parenteral Multivitamins from Light Increases Vitamin A and E Concentration in Lung of Newborn Guinea Pigs. *Clin. Nutr.* 2007, 26, 341–347, doi:10.1016/j.clnu.2006.12.006.
29. Figueiredo-Freitas, C.; Dulce, R.A.; Foster, M.W.; Liang, J.; Yamashita, A.M.S.; Lima-Rosa, F.L.; Thompson, J.W.; Moseley, M.A.; Hare, J.M.; Nogueira, L.; et al. S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca²⁺)Sensitivity in Intact Cardiomyocytes. *Antioxid. Redox Signal.* 2015, 23, 1017–1034, doi:10.1089/ars.2015.6275.
30. Fujii, J.; Osaki, T.; Bo, T. Ascorbate Is a Primary Antioxidant in Mammals. *Molecules* 2022, 27, 6187, doi:10.3390/molecules27196187.
31. Pérez-Mato, I.; Castro, C.; Ruiz, F.A.; Corrales, F.J.; Mato, J.M. Methionine Adenosyltransferase S-Nitrosylation Is Regulated by the Basic and Acidic Amino Acids Surrounding the Target Thiol. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 17075–17079, doi:10.1074/jbc.274.24.17075.
32. Lindermayr, C.; Saalbach, G.; Bahnweg, G.; Durner, J. Differential Inhibition of Arabidopsis Methionine Adenosyltransferases by Protein S-Nitrosylation. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 4285–4291, doi:10.1074/jbc.M511635200.
33. Mårtensson, J.; Jain, A.; Frayer, W.; Meister, A. Glutathione Metabolism in the Lung: Inhibition of Its Synthesis Leads to Lamellar Body and Mitochondrial Defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, 86, 5296–5300, doi:10.1073/pnas.86.14.5296.
34. Griffith, O.W.; Meister, A. Glutathione: Interorgan Translocation, Turnover, and Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 5606–5610, doi:10.1073/pnas.76.11.5606.
35. Kretzschmar, M.; Pfeifer, U.; Machnik, G.; Klinger, W. Glutathione Homeostasis and Turnover in the Totally Hepatectomized Rat: Evidence for a High Glutathione Export Capacity of Extrahepatic Tissues. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1992, 44, 273–281, doi:10.1016/S0940-2993(11)80244-7.
36. Tebay, L.E.; Robertson, H.; Durant, S.T.; Vitale, S.R.; Penning, T.M.; Dinkova-Kostova, A.T.; Hayes, J.D. Mechanisms of Activation of the Transcription Factor Nrf2 by Redox Stressors, Nutrient Cues, and Energy Status and the Pathways through Which It Attenuates Degenerative Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 88, 108–146, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.

37. Ogata, F.T.; Branco, V.; Vale, F.F.; Coppo, L. Glutaredoxin: Discovery, Redox Defense and Much More. *Redox Biol.* 2021, 43, 101975, doi:10.1016/j.redox.2021.101975.
38. Hanschmann, E.-M.; Berndt, C.; Hecker, C.; Garn, H.; Bertrams, W.; Lillig, C.H.; Hudemann, C. Glutaredoxin 2 Reduces Asthma-Like Acute Airway Inflammation in Mice. *Front. Immunol.* 2020, 11, 561724, doi:10.3389/fimmu.2020.561724.
39. Chia, S.B.; Nolin, J.D.; Aboushousha, R.; Erikson, C.; Irvin, C.G.; Poynter, M.E.; van der Velden, J.; Taatjes, D.J.; van der Vliet, A.; Anathy, V.; et al. Glutaredoxin Deficiency Promotes Activation of the Transforming Growth Factor Beta Pathway in Airway Epithelial Cells, in Association with Fibrotic Airway Remodeling. *Redox Biol.* 2020, 37, 101720, doi:10.1016/j.redox.2020.101720.
40. Nolin, J.D.; Tully, J.E.; Hoffman, S.M.; Guala, A.S.; van der Velden, J.L.; Poynter, M.E.; van der Vliet, A.; Anathy, V.; Janssen-Heininger, Y.M.W. The Glutaredoxin/S-Glutathionylation Axis Regulates Interleukin-17A-Induced Proinflammatory Responses in Lung Epithelial Cells in Association with S-Glutathionylation of Nuclear Factor KB Family Proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 73, 143–153, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.028.
41. Cahill, L.; Corey, P.N.; El-Sohemy, A. Vitamin C Deficiency in a Population of Young Canadian Adults. *Am. J. Epidemiol.* 2009, 170, 464–471, doi:10.1093/aje/kwp156.
42. Schleicher, R.L.; Carroll, M.D.; Ford, E.S.; Lacher, D.A. Serum Vitamin C and the Prevalence of Vitamin C Deficiency in the United States: 2003-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 90, 1252–1263, doi:10.3945/ajcn.2008.27016.
43. Ellis PJ, Morris TJ, Skinner BM, Sargent CA, Vickers MH, Gluckman PD, et al. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming. *BMC Genomics.* 2014;15(1):49.
44. Elremaly, W.; Mohamed, I.; Mialet-Marty, T.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Ascorbylperoxide from Parenteral Nutrition Induces an Increase of Redox Potential of Glutathione and Loss of Alveoli in Newborn Guinea Pig Lungs. *Redox Biol.* 2014, 2, 725–731, doi:10.1016/j.redox.2014.05.002.

45. Mohamed, I.; Elremaly, W.; Rouleau, T.; Lavoie, J.C. Oxygen and Parenteral Nutrition Two Main Oxidants for Extremely Preterm Infants: “It All Adds Up.” *J. Neonatal-Perinat. Med.* 2015, 8, 189–197, doi:10.3233/NPM-15814091.
46. Wang, H.; Li, F.; Feng, J.; Wang, J.; Liu, X. The Effects of S-Nitrosylation-Induced PPAR γ /SFRP5 Pathway Inhibition on the Conversion of Non-Alcoholic Fatty Liver to Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Ann. Transl. Med.* 2021, 9, 684–684, doi:10.21037/atm-21-1070.
47. Tsukahara, Y.; Ferran, B.; Minetti, E.T.; Chong, B.S.H.; Gower, A.C.; Bachschmid, M.M.; Matsui, R. Administration of Glutaredoxin-1 Attenuates Liver Fibrosis Caused by Aging and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Antioxidants* 2022, 11, 867, doi:10.3390/antiox11050867.
48. Scalcon, V.; Folda, A.; Lupo, M.G.; Tonolo, F.; Pei, N.; Battisti, I.; Ferri, N.; Arrigoni, G.; Bindoli, A.; Holmgren, A.; et al. Mitochondrial Depletion of Glutaredoxin 2 Induces Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Mice. *Redox Biol.* 2022, 51, 102277, doi:10.1016/j.redox.2022.102277.
49. Qian, Q.; Zhang, Z.; Orwig, A.; Chen, S.; Ding, W.-X.; Xu, Y.; Kunz, R.C.; Lind, N.R.L.; Stampler, J.S.; Yang, L. S-Nitrosoglutathione Reductase Dysfunction Contributes to Obesity-Associated Hepatic Insulin Resistance via Regulating Autophagy. *Diabetes* 2018, 67, 193–207, doi:10.2337/db17-0223.
50. Zhou, J.; Sheng, J.; Fan, Y.; Zhu, X.; Tao, Q.; Liu, K.; Hu, C.; Ruan, L.; Yang, L.; Tao, F.; et al. The Effect of Chinese Famine Exposure in Early Life on Dietary Patterns and Chronic Diseases of Adults. *Public Health Nutr.* 2019, 22, 603–613, doi:10.1017/S1368980018003440.
51. Xin, X.; Wang, W.; Xu, H.; Li, Z.; Zhang, D. Exposure to Chinese Famine in Early Life and the Risk of Dyslipidemia in Adulthood. *Eur. J. Nutr.* 2019, 58, 391–398, doi:10.1007/s00394-017-1603-z.
52. Painter, R.C.; Roseboom, T.J.; Bleker, O.P. Prenatal Exposure to the Dutch Famine and Disease in Later Life: An Overview. *Reprod. Toxicol.* 2005, 20, 345–352, doi:10.1016/j.reprotox.2005.04.005.
53. Barker, D.J.P.; Osmond, C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *The Lancet* 1986, 327, 1077–1081, doi:10.1016/S0140-6736(86)91340-1.

54. Lech, M.A.; Leśkiewicz, M.; Kamińska, K.; Rogóż, Z.; Lorenc-Koci, E. Glutathione Deficiency during Early Postnatal Development Causes Schizophrenia-Like Symptoms and a Reduction in BDNF Levels in the Cortex and Hippocampus of Adult Sprague–Dawley Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6171, doi:10.3390/ijms22126171.
55. Chen, Y.; Curran, C.P.; Nebert, D.W.; Patel, K.V.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V. Effect of Vitamin C Deficiency during Postnatal Development on Adult Behavior: Functional Phenotype of Gulo(– / –) Knockout Mice. *Genes Brain Behav.* 2012, 11, 269–277, doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00762.x.
56. Legault, L.M.; Doiron, K.; Lemieux, A.; Caron, M.; Chan, D.; Lopes, F.L.; Bourque, G.; Sinnott, D.; McGraw, S. Developmental Genome-Wide DNA Methylation Asymmetry between Mouse Placenta and Embryo. *Epigenetics* 2020, 1–16, doi:10.1080/15592294.2020.1722922.
57. Langley-Evans, S.C.; Welham, S.J.M.; Jackson, A.A. Fetal Exposure to a Maternal Low Protein Diet Impairs Nephrogenesis and Promotes Hypertension in the Rat. *Life Sci.* 1999, 64, 965–974, doi:10.1016/S0024-3205(99)00022-3.

Table 1. Primer sequences and their concentrations used in RT-qPCR experiments

Gene and Ensembl Code	Coded protein	Primer	Primer sequence	Concentration used (nM)
<i>Nfe2l2</i> (<i>ENSCPOG00000031261</i>)	Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2)	Forward	GCTAGATGAAGAGACAGGGGA	500
		Reverse	ACAAATGGGAATGTTTCTGCCA	
<i>Keap1</i> (<i>ENSCPOG00000038105</i>)	Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	Forward	TGCTACAACCCCATGACCAA	400
		Reverse	ACCAAGTGCCACTCGTCC	
<i>Gclc</i> (<i>ENSCPOG00000008314</i>)	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)	Forward	TGGGGAGAAGTACAACGACA	400
		Reverse	GGCATCATCCAGGTCGATCT	
<i>Gclm</i> (<i>ENSCPOG00000037468</i>)	Glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM)	Forward	CCTAGACAAAACACAGTTGGAGC	300
		Reverse	AGCTTCTTGGAACCTTGCTTCA	
<i>Gsr</i> (<i>ENSCPOG00000005290</i>)	Glutathione-disulfide reductase (GR)	Forward	ATGTTGACTGCCTGCTCTGG	300
		Reverse	TGCGTAGATGCCTTTGACACT	
<i>Glx</i> (<i>ENSCPOG00000040776</i>)	Glutaredoxin (GRX)	Forward	GATCCTCAGTCAGTTGCCCT	500
		Reverse	CGATGCAGTCTCTCCCGATG	
<i>Vcl</i> (<i>ENSCPOG00000005058</i>)	Vinculin (VCL)	Forward	ACCACAACCTCCCATCAAGCT	500
		Reverse	ACCACAACCTCCCATCAAGCT	

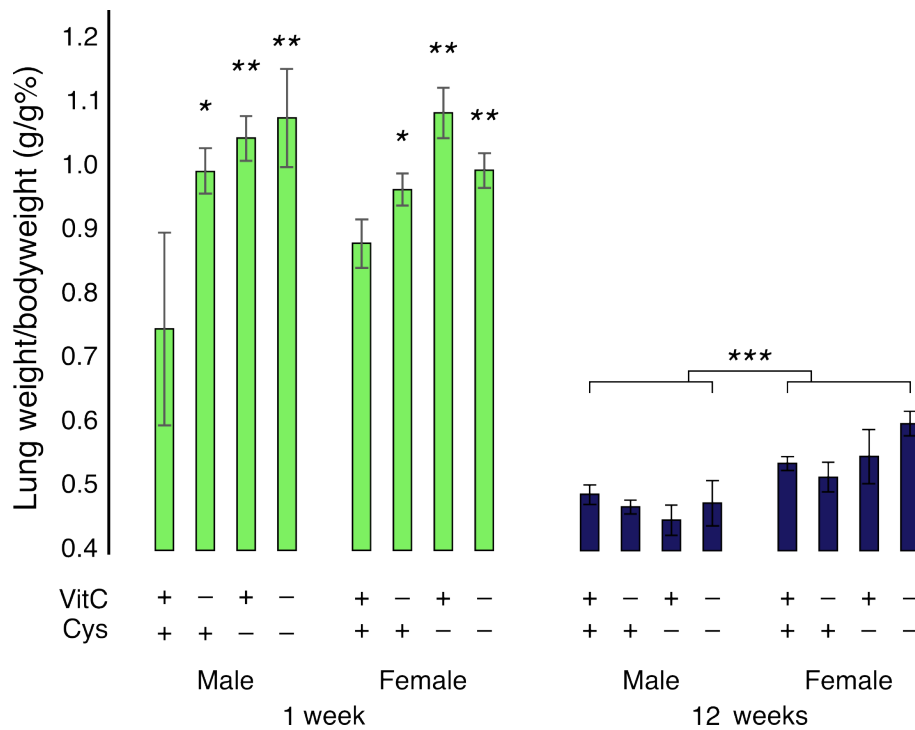


Fig 1 : Lung weight per bodyweight (g/g%) in male and female guinea pigs at 1-week and 12-week.

The percentage of lung weight was higher at 1 week of life in deficient animals from both sexes. At 12 weeks of life, no difference in the percentage of lung weight was observed among groups, but females had a higher percentage of lung weight per bodyweight. An interaction between sex and cysteine deficiency was observed, as this deficiency decreases the percentage of lung weight/bodyweight in males and increases it in females at 12 weeks of life (FCys*sex(1,24)=5.0, $p < 0.05$). Mean \pm S.E.M.; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. n=3-5/group.

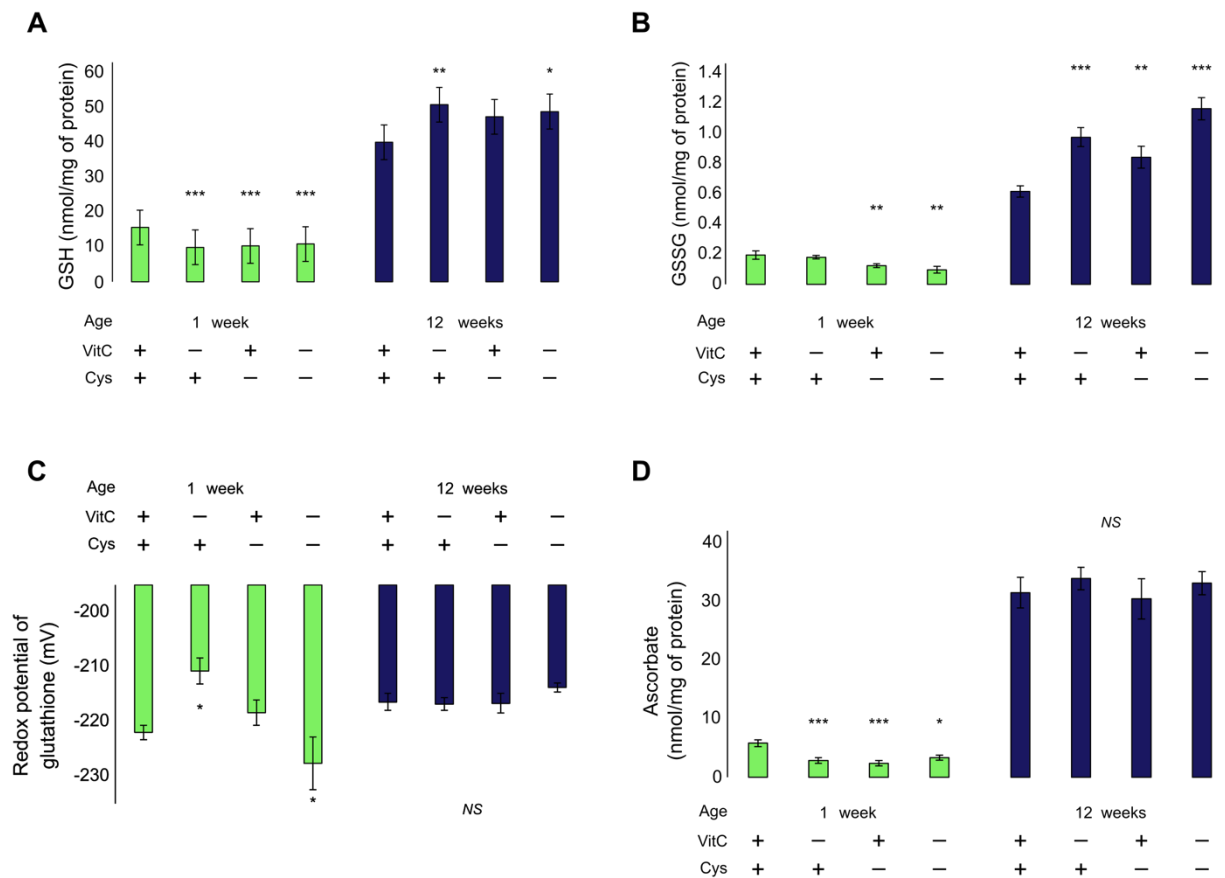


Fig 2 : Lung GSH, GSSG, redox potential of glutathione, and ascorbate in 1-week and 12-week animals.

(A): GSH levels were decreased in vitamin C and cysteine deficient animals at 1 week of life. At 12 weeks of life, early-life vitamin C deficiency increased lung GSH levels. (B): GSSG was decreased by cysteine deficiency at 1 week of life and increased by both vitamin C and cysteine deficiencies at 12 weeks. The long-term effects of vitamin C and cysteine deficiencies are independent. (C): Redox potential of glutathione was oxidized (increased) by vitamin C deficiency at 1 week and reduced (decreased) by the combination of both deficiencies. No effect of single cysteine deficiency was observed. No effect was observed at 12 weeks. (D): Lung ascorbate levels were decreased in all deficient groups at 1 week. No effect was observed at 12 weeks. Mean \pm S.E.M.; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. $n = 7-8$ /group.

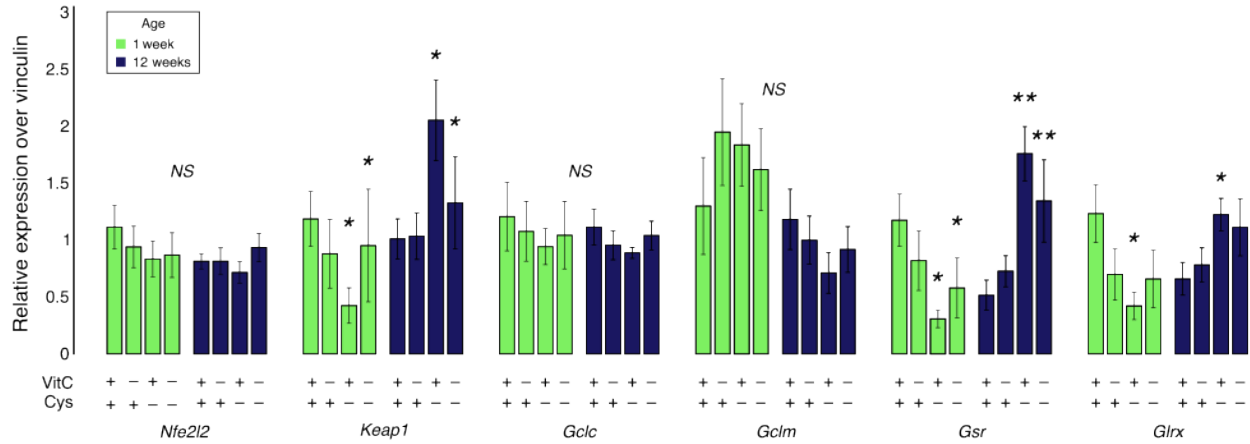


Fig 3 : Relative expression (mRNA levels) in lungs of Nfe2l2, Keap1, Gclc, Gclm, Gsr and Glrx in 1-week and 12-week animals.

No statistical effect was observed for Nfe2l2, Gclc, or Gclm. At 1 week, cysteine deficiency decreased Keap1, Gsr and Glrx gene expression. At 12 weeks, these same genes were significantly more expressed in animals who had a cysteine deficiency early in life. Mean \pm S.E.M.; NS: statistically non-significant. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. $n = 7-8$ /group.

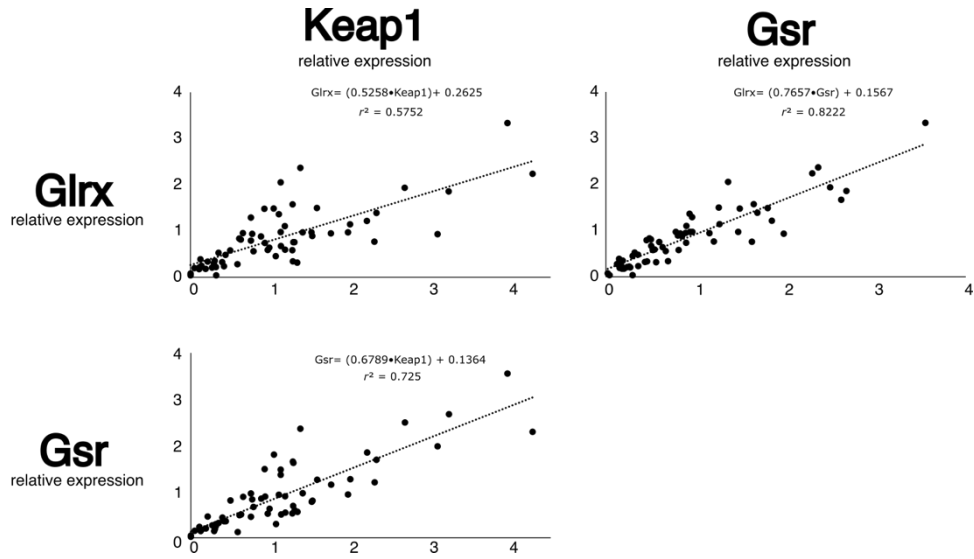


Fig 4 : Correlation between the three genes altered by cysteine deficiency (*Keap1*, *Gsr* and *Glrx*).

All three genes, correlate positively with each other, suggesting a single mechanism of modulation. Keap1 x Glrx ($Glrx_{mRNA} = 0.5258 \cdot (Keap1_{mRNA}) + 0.2625$; $r^2 = 0.58$; $p < 0.001$); Keap1 x Gsr ($Gsr_{mRNA} = 0.6789 \cdot (Keap1_{mRNA}) + 0.1364$; $r^2 = 0.73$; $p < 0.001$); Gsr x Glrx ($Glrx_{mRNA} = 0.7657 \cdot (Gsr_{mRNA}) + 0.1567$; $r^2 = 0.82$; $p < 0.001$). n=63.

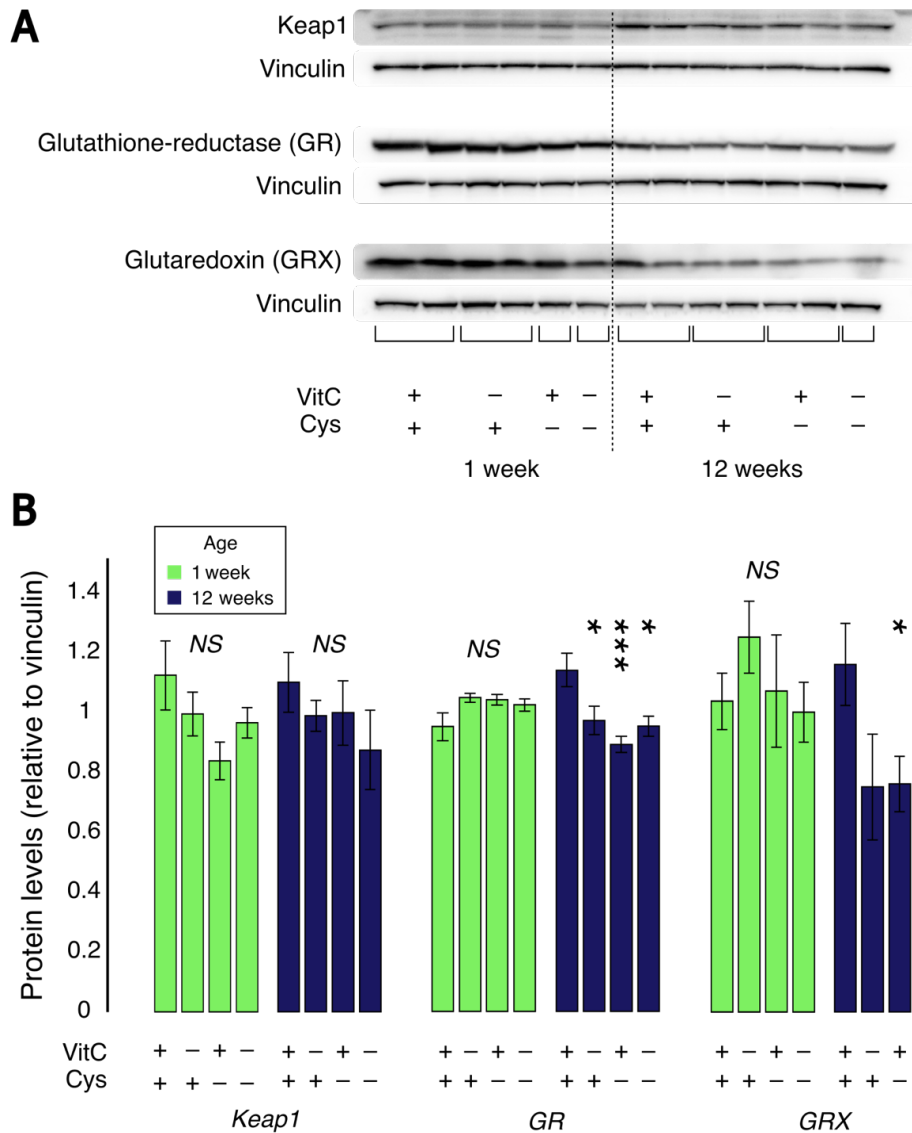


Fig 5: Protein levels of Keap1, glutathione-reductase (GR) and glutaredoxin (GRX) in lungs

(A): Representative Western blot images from Keap1, GR, GRX and vinculin as a reference protein. (B): The relative protein levels of Keap1, GR and GRX. No significant changes were observed in protein levels of all three proteins at 1 week of age. At 12 weeks, a decrease in GR protein levels were observed in all previously deficient groups ($p < 0.05$). GRX levels were decreased at 12 weeks of age in animals having received a cysteine deficient diet at neonatal age ($p < 0.05$). Mean \pm S.E.M.; NS: statistically non-significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. $n = 7-8$ / group.

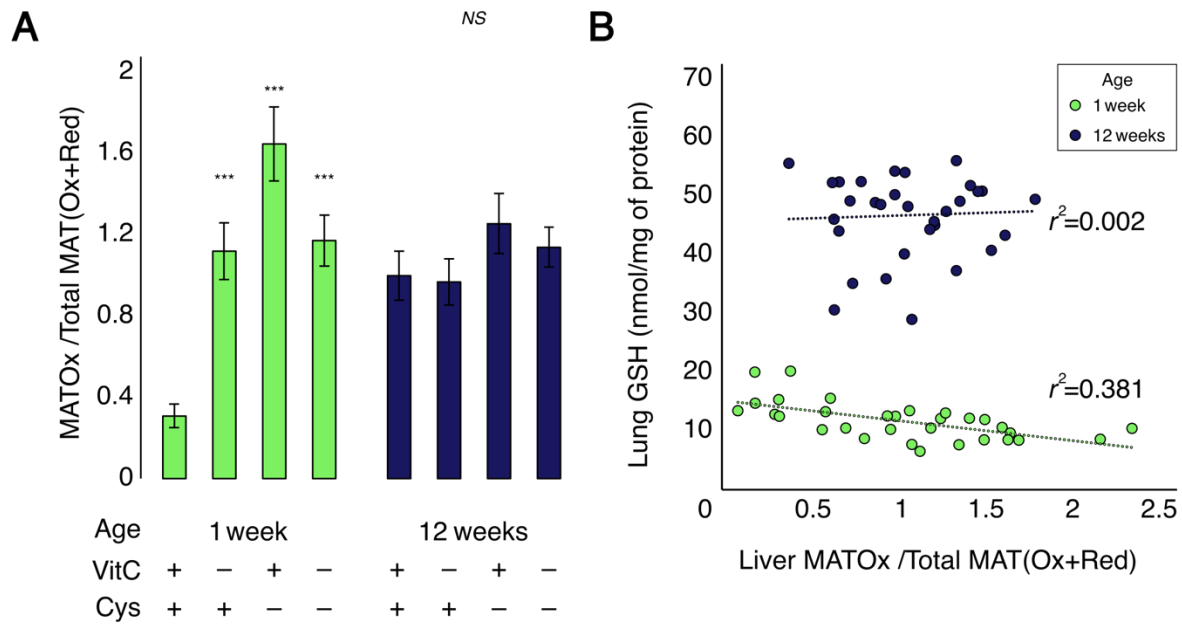


Fig 6 : Liver methionine-adenosyltransferase (MAT) oxidation and its correlation with lung GSH levels.

(A): The oxidation of MAT cysteine residues (MATOx) was increased in both vitamin C and cysteine deficient animals at 1 week of age. No significant effect was observed at 12 weeks. Mean \pm S.E.M.; NS: statistically non-significant; ***: $p < 0.001$. (B): Liver MAT oxidation negatively correlates with lung GSH levels in 1-week-old animals, but not in 12-week-old animals. $n=7-8$ /group.

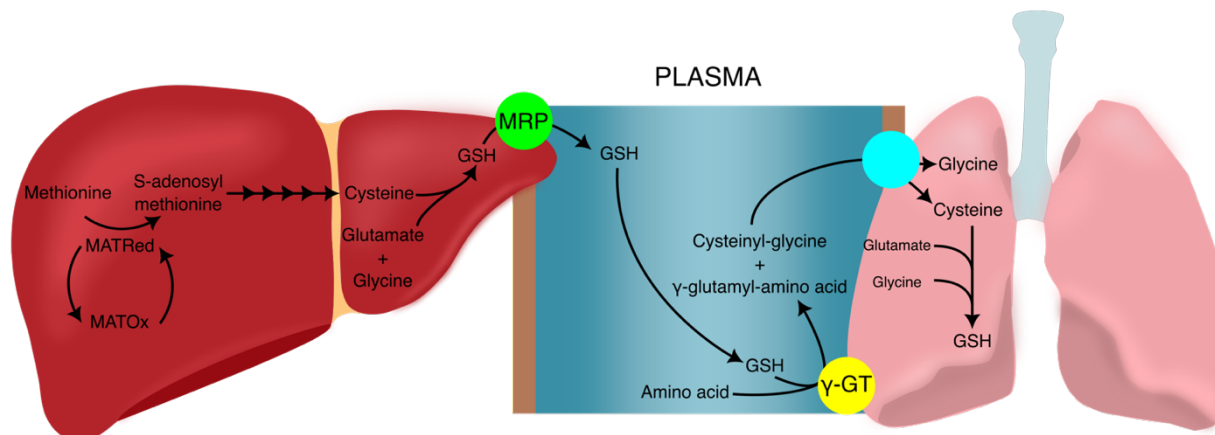


Fig 7 : The pathway of cysteine, from methionine in the liver to GSH in the lung.

In the liver, the state of oxidation of MAT determines its activity. When in a reduced state (MATRed), MAT catalyzes the limiting reaction in the transmethylation pathway, which ultimately leads to the synthesis of cysteine from methionine. Cysteine is the limiting substrate in GSH synthesis. GSH is exported from the liver by the multidrug resistance protein (MRP) in the hepatocyte membrane. In plasma, GSH is transported to extra-hepatic tissues containing γ GT, such as the lungs. γ GT breaks down GSH into cysteinylglycine and γ -glutamyl-amino acid, which are further broken down by membrane dipeptidases and imported by amino acid transporters, both represented by the blue circle. Once inside the pneumocytes, the amino acids can act as substrates for GSH synthesis. The oxidation of liver MAT blocks this interorgan pathway. GSH: glutathione; γ GT: γ -glutamyl transpeptidase; MAT: methionine-adenosyltransferase; MRP: multidrug resistance protein.

Résultats supplémentaires à la réponse de l'objectif 3

Méthylation globale de l'ADN pulmonaire

Méthode

Idem que pour la [méthylation globale de l'ADN hépatique](#)

Résultat

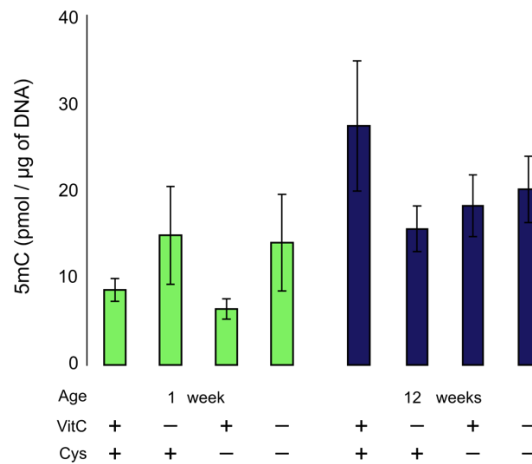


Figure 15 5-méthylcytosine pulmonaire chez les animaux déficients en vitamine C et cystéine.

Aucune différence statistique des niveaux de 5-méthyl-cytosine (méthylation globale) n'a été trouvée ($F \leq 2.4$).

Conclusions générales de l'objectif 3

L'étude des déficiences nutritionnelles en vitamine C et cystéine aux poumons démontre que :

- 1) le GSH à 1 semaine est affecté non seulement par les peroxydes de la NP (273), mais aussi par les deux déficiences nutritionnelles. Cette perturbation semble être secondaire à l'oxydation de la MAT hépatique;
- 2) une hausse de GSH et GSSG sont observés en âge adulte mais aucun débalancement de l'homéostasie semble être présent;
- 3) ces déficiences affectent l'expression des gènes impliqués dans la déglutathionylation de protéines.

Discussion

Sommaire des résultats et contribution à l'avancement des connaissances

L'objectif de ce travail était de décrire les effets immédiats et tardifs des trois facteurs de la nutrition parentérale menant à un stress oxydatif, ainsi que de spécifier la provenance des effets observés chez les animaux NP. Les résultats montrent que les peroxydes de la nutrition parentérale, ainsi que la déficience en glutathion causée par un manque de cystéine sont les deux principaux facteurs menant à des complications à long terme. Les effets de la NP et des déficiences sont résumés dans le tableau 4, où leur similarité est évaluée.

Tableau 4 Attribution des effets de la nutrition parentérale aux peroxydes, déficience en vitamine C et déficience en cystéine

	1 semaine				12 – 16 semaines			
	NP	Peroxydes	DVC	DCys	NP	Peroxydes	DVC	DCys
<i>Foie</i>								
GSH			?	?			X	X
GSSG		X				X		?
Activité de la GCK		X				X		
Activité de la PFK-1		X	?	?				
Activité de l'ACC		X			?			
Protéine GCK			X	X	?			
Protéine PFK-1			X	X	?			
Protéine ACC				X		X	X	X
<i>Poumon</i>								
GSH*		X	X	X			?	
GSSG*		X		?			?	?

Carrés : effets de la nutrition parentérale. X : effets des peroxydes, ou déficiences qui expliquent les effets de la nutrition parentérale; ? : effet inexpliqué. **Rouge** : diminution des niveaux de la variable, comparativement au groupe contrôle; **Jaune** : aucun changement des niveaux de la variable, comparativement au groupe contrôle; **Vert** : augmentation des niveaux de la variable, comparativement au groupe contrôle; NP : nutrition parentérale; DVC : Déficience en vitamine C;

DCys : Déficience en cystéine. GSH : Glutathion réduit; GSSG : Glutathion disulfure; GCK : Glucokinase; PFK-1 :Phosphofruktokinase-1; ACC : Acétyl-CoA-Carboxylase; * Les résultats concernant les effets de la nutrition parentérale aux poumons sur les niveaux de GSH et GSSG à 1 semaine de vie n'ont pas été inclus dans cette thèse mais ils ont été publiés ailleurs (Lavoie JC, Mohamed I, Teixeira V, 2022 (273)).

Tel que résumé dans le tableau 4, les peroxydes semblent être responsables du changement des niveaux de GSSG au foie à 1 semaine et en âge adulte, et aux poumons à 1 semaine. Ils expliquent aussi la modulation des activités des enzymes du métabolisme énergétique. La déficience en vitamine C et cystéine expliquent la baisse des niveaux protéiques de ces enzymes ainsi que le GSH pulmonaire à 1 semaine. Quelques effets contraires et additifs sont observés, tels que ceux sur la modulation à long terme du GSH hépatique : diminué par la déficience en vitamine C et augmenté par la déficience en cystéine; et sur les niveaux protéiques de l'ACC à long terme: diminués par les peroxydes et augmenté par les déficiences. Néanmoins, des interrogations sur les interactions statistiques demeurent. Par exemple, si les déficiences néonatales diminuent le GSH hépatique, pourquoi cet effet n'est pas observé chez les animaux nourris par la nutrition parentérale?

L'attribution des effets de la NP aux peroxydes et aux déficiences est primordiale pour la prise en charge des nouveau-nés prématurés, car il existe déjà des interventions thérapeutiques capables de les corriger. L'ajout de glutathion à la NP est capable de contrer les effets des peroxydes, ainsi que de fournir une source de cystéine pour la synthèse du glutathion, tandis que la photoprotection limite la perte de vitamine C et la génération des peroxydes (44,80,81,265,278,279).

Ce travail met en évidence l'importance du glutathion en âge néonatal, mais aussi en tant que molécule-clé pour la programmation du métabolisme en âge adulte. Il réitère l'importance d'améliorer les interventions déjà mises en place afin de limiter le stress oxydatif non seulement chez nouveau-nés prématurés sous NP, mais aussi chez tous les nouveau-nés. Bien que l'infusion de peroxydes soit réservée aux patients sous NP, la déficience nutritionnelle en vitamine C est possible et probable chez tous les nouveau-nés (91). La déficience en glutathion est présente aussi chez les nouveau-nés sous d'autres thérapies, telle que ceux recevant un traitement d'acétaminophène (280).

Au-delà de la prématurité, ce travail met en évidence l'effet programmeur de la déficience en vitamine C. Cette déficience a été capable de moduler les niveaux de glutathion en âge adulte, au foie et aux poumons. Étant donné la haute prévalence des niveaux sous-optimaux de vitamine C dans la population générale (91), il est important d'améliorer les politiques publiques visant l'apport de fruits et légumes afin de limiter cette déficience, notamment chez les mères allaitantes.

À notre connaissance, ces études sont les premières à évaluer la programmation néonatale des niveaux d'oxydation d'une protéine. Bien qu'aucun effet significatif n'ait été démontré pour l'oxydation de la MAT en âge adulte, une variation des niveaux d'ARNm de la *Glx* et *Gsr* aux poumons était démontrée, ce qui met en évidence l'importance de l'étude de l'oxydation des cystéines en tant que mécanisme médiateur des effets immédiats et tardifs du stress oxydatif néonatal. Ce travail permet aussi une meilleure compréhension des effets de l'ajout de glutathion aux solutions de nutrition parentérale. Ajouté à l'ensemble d'études de l'équipe (265,268,273,281), ce travail illustre l'innocuité du glutathion en solution de nutrition parentérale et il facilite l'avancement à des études cliniques sur l'ajout de glutathion dans les solutions de nutrition parentérale.

Contribution de chaque facteur de la NP

L'objectif pratique de ce travail de recherche est de répertorier les effets de chacun des facteurs oxydants et antioxydants de la nutrition parentérale sur le métabolisme énergétique, redox et épigénétique au foie et aux poumons. Les peroxydes, la déficience en vitamine C et la déficience en glutathion étaient identifiés comme les facteurs majeurs.

Peroxydes

Les peroxydes sont le facteur le plus étudié de la nutrition parentérale. Ils mènent à une déviation du métabolisme énergétique hépatique favorisant le métabolisme redox en détriment de la génération de l'énergie. Ce phénomène crée une inefficacité de génération d'énergie, qui est traduite en un phénotype de déficience énergétique fonctionnelle. Par conséquent, un gain de poids plus faible et un rattrapage de poids sont observés. Un paradoxe se crée aussi, car l'augmentation des apports énergétiques par la voie parentérale pourrait augmenter la charge de peroxydes et exacerber ces effets.

La limitation de l'effet des peroxydes dans la nutrition parentérale peut être abordée par 2 différentes stratégies : 1) la réduction des facteurs de la réaction de génération de peroxydes; ou 2) le soutien de la défense antioxydante du nouveau-né prématuré.

La réaction de génération de peroxydes nécessite: a) un donneur d'électrons (p. ex. vitamine C ou acides aminés); b) un récepteur d'électrons : O₂; c) des catalyseurs : riboflavine et lumière. Il est possible de limiter les concentrations d'O₂ et l'incidence de la lumière par l'utilisation des sacs et tubulures multicouche et la photoprotection, respectivement. Les sacs multicouches sont 100 fois plus imperméables à l'O₂ que les sacs à une seule couche, ce qui empêche la génération de peroxydes et préserve la vitamine C pendant au moins 48h (282,283). Dans les sacs couramment utilisés en clinique, la demi-vie de la vitamine C est de seulement 5h (76). Bien que les sacs multicouches existent depuis longtemps, les raisons pour le manque de son utilisation en clinique ne sont pas claires. La photoprotection des vitamines réduit aussi la catalyse de la réaction par la riboflavine et réduit la contamination avec peroxydes de 33% (73), en permettant la préservation de la vitamine C (80), ainsi que la survie des nouveau-nés prématurés (44).

La deuxième stratégie pour contrer les effets des peroxydes est l'ajout de glutathion dans les solutions de nutrition parentérale. Une partie des travaux présentés ici aborde cette stratégie. Le glutathion est capable de prévenir le stress oxydatif causé par la nutrition parentérale ainsi que plusieurs complications métaboliques à court et long terme. La supplémentation en glutathion a déjà été démontrée bénéfique aux poumons (265,268). L'ajout de glutathion est une bonne stratégie pour contrer une partie des effets des peroxydes, et bien que cette stratégie ne corrige pas le défaut de gain de poids, elle semble rétablir le flot glycolytique normal au foie. Il reste une stratégie prometteuse pour la santé des nouveau-nés prématurés.

Déficience en vitamine C

La déficience en vitamine C semble causer des effets plutôt à 1 semaine de vie et ses effets semblent être causés par un stress oxydatif plutôt qu'un manque de substrat essentiel à la survie. Les seuls effets spécifiques à la vitamine C étaient la baisse de l'acide ascorbique au foie et la modulation du GSH au foie et aux poumons.

La déficience en vitamine C mène à des niveaux plus bas d'acide ascorbique et GSH hépatique et pulmonaires. Ce stress oxydatif est confirmé par l'augmentation de Nrf2 cytoplasmique. Elle

augmente aussi les activités de la PFK-1 et de la GPx, ainsi qu'elle diminue la quantité de protéines de la GCK et PFK-1 à 1 semaine. Elle est capable d'augmenter aussi l'oxydation de la MAT et de diminuer la méthylation de l'ADN. À 12 semaines, cette déficience diminue les activités de la GPx et de la GR, et l'expression de la *Pfkl*, *Pfkfb2* et *Mlxipl*. Tous ses effets ne semblent pas être spécifiques à la déficience en vitamine C, car la déficience en cystéine mène à des effets similaires. Donc il est probable qu'ils soient dus à un stress oxydatif causé par la déficience en vitamine C que par le manque en ce nutriment. Cette vitamine fonctionne principalement comme antioxydant et cofacteur de quelques oxygénases. Néanmoins, la déficience n'était pas capable de diminuer les niveaux de HIF-1 α (activé par un mécanisme dépendant d'une oxygénase), vu que le Km de l'acide ascorbique pour ces enzymes est de 140 à 180 μ M (284) et que la moyenne des niveaux d'acide ascorbique hépatique passe de 591 μ M au groupe contrôle à 351 μ M au groupe déficient en vitamine C. Ces enzymes ne devraient pas être affectées par la déficience en vitamine C telle qu'établie par notre protocole. Le même effet est observé pour la TET, une deuxième enzyme utilisant l'acide ascorbique, à 1 semaine de vie. Néanmoins, il est possible que les enfants sous nutrition parentérale prolongée subissent une déficience en vitamine C plus importante que celle testée ici.

Il est essentiel de mettre l'accent sur le manque de données dans la littérature sur les besoins nutritionnels en vitamine C dans la période néonatale. La Société Européenne pour la Nutrition Parentérale et Entérale (*European Society for Parenteral and Enteral Nutrition – ESPEN*) recommande un apport en vitamine C dans la nutrition parentérale de 25mg/kg/j (85). Néanmoins, cette donnée est basée sur une seule étude observationnelle réalisée en 2001 (285), qui a détecté que cette dose ne causait pas d'effets néfastes. Aucune étude, en date de la soumission de ce travail, n'a évalué les effets à long terme de cette dose, ni chez les humains ni chez les animaux. Les concentrations utilisées en clinique au centre hospitalier universitaire Sainte-Justine – où ce travail a été réalisé – ont été prises dans la première étude de ce travail. Lorsque ces concentrations sont transposées aux cochons d'Inde, un apport de 35.6 mg/kg/j de vitamine C en résulte. Une étude comparant les doses de 10 ou 30mg/kg/j en solution de nutrition parentérale a démontré une augmentation de la vitamine C plasmatique. Cependant, aucun bénéfice sur les paramètres cliniques (jours sous nutrition parentérale, besoin d'oxygène à 36 semaines, etc.) ni sur l'incidence de rétinopathie de la prématurité ou entérocolite nécrosante n'a été démontré (286). Ces résultats indiquent que les besoins en vitamine C du nouveau-né prématuré pourraient être plus bas que les doses présentement administrées en clinique.

Il faut considérer aussi la possibilité que les effets de la NP attribués à la vitamine C ou à sa déficience (73) soient dus à un excès de vitamine C en solution. Ces effets pourraient être secondaires à un excès d'acide ascorbique, ou, indirectement par la génération de peroxydes dépendante de la vitamine C, notamment l'ascorbylperoxyde (46,76). Premièrement, des études qui limitent la génération de peroxydes et la dégradation de la vitamine C sont nécessaires. Secondement, la réévaluation des besoins en vitamine C en NP devrait suivre. Cette réévaluation tiendrait compte des nouveaux taux de dégradation de la vitamine C et elle devrait cibler une concentration de vitamine C qui permet l'accumulation de ce nutriment dans les cellules.

Les études utilisées présentement utilisent l'acide ascorbique plasmatique comme marqueur de l'adéquation des apports de vitamine C. Cependant, vu le développement néonatal des transporteurs de vitamine C, il est possible que ce marqueur ne reflète pas l'accumulation cellulaire (99). En fait, durant le développement embryonnaire, l'expression du transporteur de vitamine C SVCT1 est très basse tandis que celle du SVCT2 est plus élevée. Après la naissance, les niveaux de SVCT1 augmentent (287,288). Ce dernier, différemment du SVCT2, est un transporteur de haute capacité (289). Donc il est attendu d'avoir des faibles niveaux de vitamine C intracellulaires en période néonatale. Aussi, les concentrations plasmatiques en vitamine C ne reflètent pas son accumulation cellulaire.

Déficience en glutathion

La déficience en glutathion, causée par une déficience en cystéine, entraîne plusieurs effets qui ne semblent pas être associés à un stress oxydatif, tel que la baisse de la protéine ACC et la modulation des niveaux d'ARNm au foie et poumon. L'hypothèse que le glutathion/cystéine cause des effets spécifiques est renforcée lors de la comparaison de ses effets avec ceux causés par les peroxydes. Ils semblent être indépendants et parfois opposés. Par exemple, les peroxydes diminuent l'activité de la PFK-1 à 1 semaine, mais la déficience en cystéine l'augmente.

Cette déficience a mené à une baisse de GSH hépatique et pulmonaire, d'acide ascorbique pulmonaire, et une augmentation des niveaux cytoplasmiques de Nrf2, comme la déficience en vitamine C. Ces effets pourraient être attribués à un stress oxydatif secondaire à la baisse des espèces antioxydantes, de même que les effets à long terme sur l'expression de *Pfkfb2* et *Mlxipl*.

En plus, la déficience en cystéine a causé une diminution des niveaux protéiques de l'ACC et l'expression de *Srebfl* hépatique et elle a augmenté les niveaux de *Gkr*, *Prkaa* et *Ppargc1a* à court terme. Aux poumons, les niveaux de *Keap1*, *Gsr* et *GlrX* sont diminués en âge néonatal et augmentés en âge adulte. Bien que les deux déficiences aient modulé les niveaux d'ARNm, la déficience en cystéine était la seule à causer des effets à long terme spécifiques à la déficience et non dus à un stress oxydatif. Il est possible que ces effets soient provoqués par la modulation des voies GCN2 et mTOR, qui peuvent, à leur tour, activer la transcription de plusieurs gènes du métabolisme de glucides, lipides, et défense antioxydante (290).

Les effets tardifs de la déficience en cystéine sont aussi remarquables. La faible expression des gènes en âge néonatale se transforme en une surexpression des mêmes gènes. Bien qu'une tendance à l'hypométhylation de l'ADN à l'âge adulte et une activité de TET plus basse auraient pu expliquer les niveaux d'ARNm plus élevés, cette tendance est aussi retrouvée chez les groupes déficients en vitamine C. La méthylation spécifique de chacun de ces gènes doit être étudiée. La relation entre un stress oxydatif et plusieurs mécanismes épigénétiques a déjà été démontrée (81,162). Néanmoins, une seule étude a évalué l'effet de la supplémentation en cystéine sur la méthylation de l'ADN, avec une démonstration de l'hypérméthylation des gènes *Gclc* et *Cdo* (Cystéine Dioxygénase – impliqués dans l'oxydation de la cystéine en taurine ou pyruvate) (291). Bien que ces effets soient en accord avec ceux démontrés ici, l'utilisation d'un modèle de sittelle (oiseau) est une limite aux inférences aux cochons d'Inde et aux humains.

Autres facteurs

Il est essentiel de mentionner d'autres facteurs présents dans la nutrition parentérale qui auraient pu jouer un rôle sur les résultats. Les aldéhydes et le mode d'administration sont les deux les plus importants à mentionner. Les aldéhydes comme le 4-hydroxynonanal et 4-hydroxyhexanal sont générés dans les solutions de NP, notamment celles où les vitamines sont ajoutées aux émulsions lipidiques (292). Ces molécules sont capables de générer un stress oxydatif par la consommation du glutathion, en plus d'activer des voies inflammatoires et la voie « *mitogen-activated protein kinases* » (MAPK), qui jouent un rôle sur la régulation du métabolisme énergétique, antioxydant et épigénétique (293). Puisqu'en clinique, et dans notre protocole animal, les vitamines ne sont pas ajoutées aux émulsions lipidiques, la contribution des aldéhydes est moindre que celle des

peroxydes, l'effet des aldéhydes n'était pas étudié ici. Néanmoins, il existe encore une génération d'aldéhydes qui pourrait jouer un rôle sur les résultats observés.

Le deuxième facteur est le mode d'administration de la NP. La structure du foie a évolué afin de recevoir des nutriments provenant de l'absorption intestinale par la veine porte, ainsi que de sécréter et d'excréter des métabolites par la veine centrale. La veine porte est placée distalement au lobule hépatique, ce qui génère un gradient de nutriments dans les hépatocytes. Puisque ces nutriments ont des effets programmeurs, les hépatocytes plus proches de la veine porte ont une plus haute capacité glycolytique et lipogénique, tandis que ceux proches de la veine centrale ont une fonction plus sécrétoire (11,49,294). Les cochons d'Inde nourris par NP reçoivent leurs nutriments par la veine centrale, en renversant le gradient de nutriments et exposant les cellules sécrétoires à des stimulus métaboliques, notamment dans la période développementale. Par exemple, la glucokinase est distribuée également dans tout le lobule hépatique lors de la naissance et avec les stimulus nutritionnels provenant de la veine porte, l'expression de la glucokinase se concentre proche de cette veine (11). Si le stimulus provient plutôt de la veine centrale avec les nutriments de la nutrition parentérale, les hépatocytes proches de la veine centrale joueraient un rôle plutôt métabolique. Après la cessation de la nutrition parentérale et initiation de l'alimentation orale, les hépatocytes périphériques n'auraient pas la programmation nécessaire pour métaboliser les nutriments adéquatement, et à long terme, des complications métaboliques pourraient avoir lieu. Ce phénomène est un des responsables du développement de la cholestase secondaire à la nutrition parentérale (48). Cependant, les études sur l'impact de la nutrition parentérale sur la distribution des enzymes dans le lobule hépatique et ses complications à long terme sont rares. Il serait possible que ce phénomène ait eu un impact sur les résultats observés, par une voie indépendante du stress oxydatif.

Le paradoxe de la double déficience

Originellement, le groupe double déficient en vitamine C et cystéine était inclus dans le protocole expérimental afin de créer un groupe qui ressemblerait aux animaux nourris par nutrition parentérale, sans l'effet des peroxydes. Cependant, plusieurs interactions statistiques entre ces deux déficiences nous indiquent que les mécanismes de programmation métabolique par le manque de ces nutriments sont plus complexes que ce qui était attendu.

L'interaction statistiques entre les deux déficiences est parfois interprétée comme l'atteinte d'un plateau. Cela est le cas du GSH hépatique et pulmonaire, l'activité de la PFK-1, les niveaux protéiques de la GCK et PFK-1, ainsi que l'oxydation de la MAT à 1 semaine de vie. Cependant, la double déficience a aussi parfois donné des résultats contraires à ceux des déficiences isolées. C'est le cas de la méthylation globale de l'ADN au foie à 1 semaine, et l'expression du *Mlxipl* à 12 semaines. Des effets similaires ont été déjà observés dans un modèle similaire. Une étude en particulier a testé la combinaison des effets de la malnutrition durant la période de gestation, avec ceux du traitement avec la leptine sur la progéniture. La leptine en période néonatale réduit la consommation et mime la malnutrition. Bien que la malnutrition gestationnelle et la leptine aient des effets très similaires dans la modulation de l'expression des gènes du métabolisme énergétique, mitochondrial et de la réponse immunitaire, la combinaison des deux inhibe cette programmation (295).

Les mécanismes sous-jacents à ces interactions statistiques ne sont pas connus, mais deux hypothèses peuvent être émises : 1) La déficience en vitamine C offre un effet protecteur. Tel que discuté [précédemment](#), il est possible que les besoins en vitamine C chez les nouveau-nés prématurés soient beaucoup plus bas que les quantités infusées en NP, et que les effets de sa déficience soient causés par les produits de sa dégradation. Donc, il serait aussi possible qu'une déficience à court terme comme celle de ce protocole expérimental pourrait avoir un effet protecteur par la réduction des niveaux de vitamine C acceptables. Étant donné le manque d'études dans ce domaine, cette hypothèse demeure abstraite et spéculative. 2) Plusieurs mécanismes épigénétiques jouent un rôle. Les résultats démontrent une hypométhylation globale de l'ADN au foie à 1 semaine, mais il n'est pas possible d'inférer directement sur la méthylation spécifique de chaque gène impliqué. L'inactivation oxydative de la MAT est en lien avec ce résultat. Des niveaux plus bas du donneur de méthyle, S-adénosyl-méthionine, sont soupçonnés. Donc, la méthylation des histones devrait aussi être affectée. Ce mécanisme peut activer ou inactiver des gènes, dépendamment du résidu de lysine méthylé et la quantité de groupes méthyles ajoutés. La variation du potentiel redox entre les groupes déficients pourrait affecter le niveau de méthylation de l'ADN et des histones en (des)activant l'expression des gènes à 1 et 12 semaines de vie.

L'équipe a déjà démontré une hyperméthylation de l'ADN chez les cochons d'Inde nourris par nutrition parentérale (81), tandis que les résultats présentés ici illustrent une hypométhylation lors des déficiences seules, et aucune différence suite à la double déficience. Cet exemple de la

méthylation de l'ADN met en évidence l'impossibilité d'une inférence directe de ces résultats aux nouveau-nés prématurés sous NP, car plusieurs autres facteurs jouent un rôle sur leur état de santé. Le but de ce travail était d'isoler les effets de deux de ces facteurs et ce dernier est accompli. Néanmoins, il faut tenir compte que ces déficiences et les peroxydes ne se présentent rarement seuls, et que les interactions statistiques entre eux peuvent changer le résultat final des variables étudiées.

Le NADPH à la source des complications hépatiques de la NP

La NP semble mener à une déviation du métabolisme énergétique à 1 semaine de vie. Ce phénomène est démontré par une activation de la glucokinase et une inactivation de la phosphofructokinase-1, associé à une augmentation des niveaux de NADPH. Cette déviation aurait pour but d'augmenter les concentrations de NADPH pour le recyclage du GSSG, qui est aussi augmenté dans le foie des animaux nourris avec la NP sans ajout de glutathion. L'effet secondaire de cette augmentation des niveaux de NADPH semble être une augmentation de l'accumulation de lipides hépatiques.

Le NADPH est utilisé pour le recyclage du glutathion par la glutathion-réductase (GR) et la lipogenèse par l'acide gras synthétase (AGS). Cette dernière enzyme utilise l'acétyl-CoA et le NADPH pour la synthèse de lipides, ainsi que le malonyl-CoA produit par l'ACC. Néanmoins, 1 mole de malonyl-CoA est nécessaire pour 7 moles d'acétyl-CoA et 7 moles de NADPH. Le K_m de l'AGS pour l'acétyl-CoA est de $0.8\mu\text{M}$ (296), tandis que les concentrations cellulaires d'acétyl-CoA sont 10x plus élevées ($7-10\mu\text{M}$ (297)), ce qui indique qu'il ne limite pas la réaction de l'AGS. Les faibles niveaux de NADPH limitent cette réaction. Nous avons trouvé une concentration de $0.2 \pm 0.05\mu\text{M}$ de NADPH aux foies des cochons d'Inde nourris par voie orale et $0.4 \pm 0.1\mu\text{M}$ chez les animaux nourris par NP –alors que le K_m de l'AGS est de $25\mu\text{M}$ (296). Conséquemment, la diminution de l'activité et des niveaux protéiques de la PFK-1 et de l'ACC, ne devrait pas affecter les concentrations de lipide hépatiques à la même ampleur que l'augmentation des niveaux de NADPH. Pour cette raison, une augmentation de l'accumulation de lipides hépatiques est observée, concomitante à une diminution de l'activité et des niveaux protéiques de l'ACC, l'enzyme qui contrôle la lipogenèse. L'ajout de GSSG dans la NP corrige les niveaux de NADPH, GSSG, les

activités de la GCK et de l'ACC, ainsi que l'accumulation de lipides au foie. Ces résultats illustrent l'effet des peroxydes sur le métabolisme redox.

L'expression génique et les niveaux de protéines au foie

La NP mène à une diminution des niveaux protéiques de glucokinase, phosphofructokinase-1, et acétyl-CoA-carboxylase. Ces diminutions ne sont pas corrigées par l'ajout de GSSG dans la NP, ce qui exclut l'effet des peroxydes. Cependant, ce même effet est observé chez les animaux ayant reçu une diète déficiente en vitamine C et cystéine. Néanmoins, chez ses animaux, aucune différence des niveaux d'ARNm n'a été identifiée. Ces résultats illustrent un possible défaut de la traduction protéique. Bien que quelques études démontrent l'effet inhibiteur des EROs sur la synthèse protéique (298), notre équipe a déjà démontré l'effet inhibiteur, et indépendant des peroxydes, de la NP sur la synthèse protéique aux poumons et au foie (266). En fait, la déficience en cystéine stimule les kinases sensibles aux acides aminés « *general control nonderepressible 2* » (GCN2)(299,300) et inhibe la « *mammalian target of rapamycin* » (mTOR) (301), ce qui résulterait en une suppression de la synthèse protéique générale, même avec des niveaux élevés d'ARNm. Ces effets sur GCN2 et mTOR expliqueraient non seulement la discordance entre les niveaux d'ARNm et protéines pour l'ACC, mais aussi pour la PFK-1/*Pfkl*, ainsi que la réduction de la synthèse protéique déjà observée dans un modèle de nutrition parentérale (266). De même, cette modulation expliquerait les niveaux protéiques plus bas de la GCK.

Parallèlement, plusieurs études démontrent l'effet stimulant du stress oxydant sur l'augmentation de l'expression génique du *Srebf1* et *Acaca*, ainsi que l'augmentation des niveaux protéiques de SREBP-1c et ACC (302–305). Néanmoins, dans notre modèle, une diminution de l'expression de *Srebf1* par la déficience en cystéine et une augmentation de *Acaca* par la double déficience sont observées, accompagnées d'une diminution des niveaux protéiques de l'ACC par la déficience en cystéine. Le défaut d'activation du SREBP-1c pourrait aussi expliquer la discordance entre l'expression de *Srebf1* et *Acaca* (302).

À long-terme, une diminution de la *Pfkl* est observée chez les mâles ayant reçu une diète déficiente en vitamine C en âge néonatal. Les deux déficiences induisent une diminution de la *Pfkfb2*, tandis que les déficiences seules diminuent les niveaux de *Mlxipl*. Parallèlement, une augmentation des niveaux de méthylation globale a été observée, ce qui représenterait une extinction de l'expression

génique. Bien que l'expression de ces gènes ne se corrèle pas avec la méthylation globale de l'ADN, nous n'avons pas évalué la méthylation spécifique des promoteurs de ces gènes. La méthylation globale offre un aperçu du métabolisme épigénétique seulement. Néanmoins, il est intéressant de noter que l'hyperméthylation globale est accompagnée d'une diminution de l'expression de ces gènes (aucune augmentation significative n'a été trouvée). La mesure de la méthylation des promoteurs de ces gènes est essentielle pour la compréhension de ces résultats. L'interaction statistique entre les deux déficiences (*Mlxipl*) ou entre la déficience en vitamine C et le sexe (*Pfkl*) est aussi un aperçu de la complexité des mécanismes affectés. Un effet de la signalisation de l'estrogène et de la testostérone est soupçonné, étant donné leur effet sur l'expression du ChREBP et de la PFK-1 (306–309). Puisque l'évaluation de ces facteurs hormonaux ne faisait pas partie des objectifs de l'étude, nous n'avons pas procédé à leur évaluation, mais il reste important de les aborder dans une étude future dessinée spécifiquement à ce but.

Cadre conceptuel

Tous ces résultats s'insèrent bien dans les concepts et hypothèses déjà existantes des Origines développementales de la santé et des maladies (ODSM) telles que l'hypothèse du phénotype économe, la plasticité et l'incompatibilité développementale. Tel que déjà discuté dans la [réponse à l'objectif 3](#), l'hypothèse du phénotype économe pourrait s'appliquer au métabolisme redox aux poumons. Cette hypothèse était originalement conçue pour expliquer les effets d'une malnutrition durant la période gestationnelle sur le risque de maladies cardiovasculaires (138,141). Néanmoins, il est possible que le métabolisme redox aux poumons soit programmé par des mécanismes similaires. Ces résultats sont aussi supportés par la diminution de l'activité physique chez ses animaux. Cependant, la plasticité développementale permet une meilleure compréhension de la fonction des adaptations à la survie de l'individu.

La plasticité développementale décrit les adaptations physiologiques déployées durant le développement (de la conception à l'adolescence), déclenchées par des signaux environnementaux, permettant une meilleure adaptation à l'environnement (147,310). Bref, c'est une calibration biologique à l'environnement. Cette adaptation peut entraîner des conséquences négatives lorsque

l'individu s'adapte à un environnement néonatal qui n'est pas représentatif de son environnement adulte. Dans une telle situation, une incompatibilité environnementale a lieu.

Il est possible que les déficiences nutritionnelles et le stress oxydatif de la nutrition parentérale activent des voies métaboliques de manque de nutriments tel que discuté auparavant. Ces voies permettent la saisie de l'environnement néonatal comme un environnement pauvre en nutriments ce qui adapterait le métabolisme à des fonctions plus anaboliques. Ce phénomène expliquerait l'activité physique spontanée réduite pour une même consommation alimentaire à 4-5 semaines de vie, et le poids corporel similaire au groupe contrôle, malgré la consommation alimentaire réduite chez les animaux déficients de 12 semaines de vie. Un deuxième exemple de la plasticité développementale observé dans ce travail est l'effet sur les marqueurs de stress oxydatif. Un stress oxydatif en âge néonatal par la nutrition parentérale ou les déficiences diminue les défenses antioxydantes au foie et au poumon. Cela pourrait être interprété physiologiquement comme un développement dans un environnement riche en oxydants. Donc, l'organisme met en place des adaptations permettant une défense antioxydante plus élevée en âge adulte. Cela est démontré par les niveaux plus élevés de glutathion total aux poumons et GSH et ascorbate au foie des animaux déficients, ainsi que moins de GSSG au foie des animaux recevant la NP en début de vie. Ces effets sont aussi observés au niveau de l'expression plus élevée de *Gsr* et *GlrX* aux poumons, deux gènes qui soutiennent le processus de déglutathionylation.

Puisque le diagnostic des maladies n'était pas fait, et que ces animaux ne semblent pas développer des signes de maladie ou complications, il n'est pas possible de démontrer une vraie incompatibilité environnementale. Il serait même possible que les adaptations pulmonaires soient bénéfiques, puisque la déglutathionylation est associée à une réduction de l'état inflammatoire. Cela pourrait apporter des bénéfices dans la prévention des maladies pulmonaires caractérisées par l'inflammation (311–313). Néanmoins, l'augmentation du sédentarisme serait une adaptation incompatible à un environnement obésogène ou l'offre alimentaire est abondante. Cette incompatibilité développementale pourrait avoir des effets néfastes sur le développement des complications métaboliques chroniques.

Forces et limites

L'originalité de cette étude est sa plus grande force. Ces études sont les seuls à évaluer les effets de chacun des éléments de la nutrition parentérale menant à une modulation du métabolisme redox à court et long terme. Bien que d'autres études aient évalué les effets des peroxydes, de la vitamine C et cystéine/glutathion ou de leur déficience, aucune comparaison entre ces facteurs ni observation des effets à long terme n'étaient faites. L'utilisation du modèle animal de cochon d'Inde permet l'étude d'un métabolisme redox qui est plus proche de celui de l'humain, vu l'incapacité de ces deux espèces de synthétiser la vitamine C de façon endogène. Bien que l'utilisation de souris génétiquement modifiées sans la capacité de synthétiser la vitamine C soit possible, le métabolisme redox reste différent de celui des humains (314). Parallèlement, la déficience en cystéine permet de générer la déficience en glutathion similaire à celle observée chez les nouveau-nés prématurés sous nutrition parentérale, vu leurs immaturités au niveau des voies de transméthylation et transsulfuration (40,41,131). Enfin, l'utilisation des mâles et femelles dans les études des déficiences non seulement permet d'avoir un aperçu des différences entre les sexes, mais aussi d'avoir une variation plus élevée dans les résultats, et par conséquent, un modèle expérimental plus robuste. Ce modèle permet alors une meilleure inférence des résultats aux humains.

Bien que cette variation plus élevée concède la robustesse à l'étude, elle ajoute aussi une complexité d'analyse de résultats qui aurait pu brouiller l'interprétation des résultats. Une autre limite possible est la durée de traitement. Bien que la durée de la nutrition parentérale fût déjà démontrée efficace pour générer des effets similaires à ceux observés chez l'humain, il est possible que la durée de la déficience en vitamine C ne n'ait pas été assez longue pour démontrer des effets similaires à ceux de la nutrition parentérale néonatale. Cette observation est basée sur la tendance de variation des résultats dans ce groupe qui est souvent similaire à celle observée pour le groupe déficient en cystéine. Bien que cette durée soit équivalente à celle déterminée dans le modèle de nutrition parentérale, il est possible qu'elle ne reflète pas la déficience observée chez les nouveau-nés sous nutrition parentérale pour de longues durées. Néanmoins, les tendances observées donnent des pistes de recherche. La durée de l'étude peut être aussi considérée comme une limite. Bien que l'expression « long terme » soit utilisée dans cette thèse, un meilleur aperçu des conséquences à long terme aurait inclus aussi des âges plus avancés. Les coûts élevés de cette approche la rendent moins envisageable.

Il est possible aussi que les doses de GSSG choisies ne soient pas appropriées à l'étude des effets des peroxydes. Bien que ces doses étaient choisies à la suite d'une étude de dose-réponse avec la correction du glutathion plasmatique comme issu primaire (273), il est possible que des doses plus élevées soient nécessaires pour la correction des paramètres hépatiques qui n'étaient pas corrigés.

Une autre limite pour la compréhension des interactions statistiques est le manque d'un groupe qui combine les effets isolés et combinés des peroxydes avec les déficiences en vitamine C et cystéine. Cela pourrait être atteint par la répétition du protocole expérimental de l'[objectif 2](#) avec l'infusion de peroxydes par voie parentérale. Enfin, il serait possible que quelques effets observés chez les animaux déficients en cystéine ne soient pas une conséquence directe de la déficience en glutathion. La diminution de la synthèse protéique – soit par baisse disponibilité de cystéine, soit par l'activation de GCN2 et inhibition de mTOR – pourrait être un facteur confondant des résultats, notamment les niveaux protéiques et l'expression relative des gènes.

Perspectives futures

Plusieurs questions de recherche sont posées à la suite de cette étude. Bien que nous ayons détecté une différence des niveaux de méthylation d'ADN et des différences d'expression génique, nous n'avons pas exploré comment la modulation épigénétique affecte la programmation du métabolisme énergétique et redox dans ce modèle. Plusieurs rapports de recherche (81,162,315) décrivent cet effet, mais les spécificités mécanistiques n'ont pas été encore comprises. D'autres mécanismes de programmation doivent aussi être explorés, tels que les changements morphologiques et structuraux des organes (152,153), et l'oxydation et glutathionylation développementale de protéines. L'étude des déclencheurs de ces mécanismes de programmation doit être faite aussi, telle que l'activation de GCN2 et l'inactivation de mTOR par la cystéine/glutathion (316–318). Il serait aussi important de caractériser l'impact de ces déficiences chez les mâles et femelles. Bien que cette étude ne fût pas conçue pour détecter ces différences, quelques disparités et interactions statistiques montrent que ces différences existent.

Nous démontrons un risque plus élevé à la stéatose hépatique chez les animaux nourris par nutrition parentérale en âge néonatal. Cependant, aucune maladie n'est observée. Il est important de confirmer l'importance de ces résultats avec une deuxième insulte nutritionnelle en âge adulte, par exemple, une diète riche en gras. Ce type de protocole a été déjà testé chez les animaux nés des

mères avec le diabète gestationnel, consommant une diète riche en gras ou la malnutrition et dans les trois cas, les facteurs de programmation augmentent le risque de développement de maladies. Ce n'est qu'avec une deuxième insulte en âge adulte (diète riche en gras) que la progéniture a développé des maladies (295,319,320). Il serait pertinent aussi d'évaluer ce type de protocole au niveau du métabolisme redox. Puisque les animaux ont un état plus réduit au foie et au poumon, une insulte oxydative en âge adulte serait importante pour déterminer si : 1) les individus ayant reçu la nutrition parentérale en âge néonatal sont plus préparés à des insultes oxydatives ; 2) si l'état plus réduit est une adaptation développementale qui n'apporte pas de bénéfices ; 3) ou si cet état réduit engendre plus de complications après l'insulte oxydative.

Ce travail met aussi en évidence la possibilité de faire des prédictions du risque de développement de maladies en âge adulte selon les événements en début de vie. Donc, la recherche des marqueurs spécifiques en âge adulte de l'occurrence de ces événements néonataux est primordiale. Avec ces données, des algorithmes de traitement de maladies chroniques pourraient être créés afin de personnaliser la prise en charge nutritionnelle et médicale des individus, notamment ceux avec des maladies chroniques complexes tels que l'obésité, diabète et stéatose hépatique. Présentement, des études *in silico* sont capables de modéliser des voies métaboliques en santé et en maladie (321,322). L'avancement de connaissances permettra une modélisation aussi des traitements adéquats et personnalisés à chaque individu.

Puisque cette étude a aussi collecté des évidences sur l'efficacité du glutathion ajouté dans les solutions de nutrition parentérale chez les enfants, l'étude clinique de phase 1 chez les nouveau-nés prématurés est dans l'avenir proche.

Conclusion

La nutrition parentérale chez les nouveau-nés prématurés est une intervention qui permet la survie des nouveau-nés prématurés mais qui apporte des effets secondaires immédiats et tardifs. Ces effets sont principalement causés par les peroxydes qui la contaminent, une déficience en vitamine C et/ou une déficience en glutathion/cystéine. À l'étude de ces trois facteurs, nous avons identifié qu'ils modulent l'homéostasie redox au foie et aux poumons d'une façon complexe et synergique. Les activités des enzymes du métabolisme énergétique au foie sont modulées plutôt par les peroxydes, tandis que les niveaux protéiques sont modulés par les déficiences en vitamine C et cystéine. Ensemble, ces trois facteurs génèrent un phénotype de déficience énergétique et du stress oxydatif au foie. Étant donné la dépendance pulmonaire de la synthèse de glutathion hépatique, les poumons subissent aussi un stress oxydatif.

À long-terme, les effets tardifs sont inverses à ceux observés en âge néonatal, mais les peroxydes et les déficiences restent responsables des effets de la nutrition parentérale néonatale. Les effets à long-terme sont probablement causés en partie par une modulation de la méthylation de l'ADN, mais plus d'investigations sont nécessaires. Les interactions statistiques entre ces facteurs sont remarquables et essentielles pour la compréhension des effets de la nutrition parentérale.

Ces résultats démontrent le besoin urgent de l'application des interventions qui limitent la génération de peroxydes et la déficience en glutathion en âge néonatale. Ces interventions auraient l'objectif de prévenir les effets immédiats et tardifs sur le risque de maladies hépatiques, pulmonaires et métaboliques. La photoprotection, l'utilisation des sacs multicouches et l'ajout de glutathion aux solutions de nutrition parentérale sont des interventions prometteuses.

Références bibliographiques

1. Harpavat S. Structural and functional development of the hepatobiliary system. In: *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2022 Oct 19]. p. 734-743.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323672931000670>
2. Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell*. 2002;9(2):279–89.
3. Spence JR, Lange AW, Lin SCJ, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, et al. Sox17 Regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell*. 2009;17(1):62–74.
4. Carpentier R, Suñer RE, van Hul N, Kopp JL, Beaudry J, Cordi S, et al. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1432-1438.e4.
5. Strazzabosco M, Fabris L. Development of the bile ducts: Essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol*. 2012;56(5):1159–70.
6. Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int*. 1997;51(2):402–12.
7. Martin A, Faes C, Debevec T, Rytz C, Millet G, Pialoux V. Preterm birth and oxidative stress: Effects of acute physical exercise and hypoxia physiological responses. *Redox Biol*. 2018;17:315–22.
8. Saphier O, Schneid-Kofman N, Silberstein E, Silberstein T. Does mode of delivery affect neonate oxidative stress in parturition? Review of literature. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(3):403–6.
9. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1–15.
10. Morton SU, Brodsky D. Fetal physiology and the transition to extrauterine life. *Clin Perinatol*. 2016;43(3):395–407.

11. Kirchner G, Harbers M, Bünsch A, Seitz HJ, Höppner W. Zonation of glucokinase in rat liver changes during postnatal development. *FEBS Lett.* 1993;328(1–2):119–24.
12. Yeung D, Oliver IT. Development of gluconeogenesis in neonatal rat liver. Effect of premature delivery. *Biochem J.* 1967;105(3):1229–33.
13. Hamer MJ, Dickson AJ. Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment. *Biochem J.* 1987;245(1):35–9.
14. Burch HB, Lowry OH, Kuhlman AM, Slerjance J, Diamant EJ, Lowry SR, et al. Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat liver. *J Biol Chem.* 1963;238(7):2267–73.
15. Burch HB. Biochemical changes in the perinatal rat liver. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;111(1):176–82.
16. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. [Internet]. Vol. 46, *Ann. Rev. Physiol.* 1984 p. 617–45. Available from: www.annualreviews.org
17. Cardoso WV, Lü J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development.* 2006;133(9):1611–24.
18. Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development – alveolar formation and growth. *Neonatology.* 2006;89(4):313–22.
19. Kitaoka H, Burri PH, Weibel ER. Development of the human fetal airway tree: Analysis of the numerical density of airway endtips. *Anat Rec.* 1996;244(2):207–13.
20. Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):427–44.
21. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977;56(3):247–53.
22. WHO. Preterm Birth [Internet]. 2018. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>

23. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*. 2012;379(9832):2162–72.
24. Delnord M, Zeitlin J. Epidemiology of late preterm and early term births – An international perspective. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2019;24(1):3–10.
25. Matthews TJ, MacDorman MF, Thoma ME. Infant mortality statistics from the 2013 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep Cent Dis Control Prev Natl Cent Health Stat Natl Vital Stat Syst*. 2015;64(9):1–30.
26. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2015;314(10):1039–51.
27. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*. 2015;120(6):1337–51.
28. Philip AGS. The evolution of neonatology. *Pediatr Res*. 2005;58(4):799–815.
29. Rennie JM, Bokhari SA. Recent advances in neonatology. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. 1999;81(1):F1–4.
30. Mabrouk A, Abubakar A, Too EK, Chongwo E, Adetifa IM. A scoping review of preterm births in sub-saharan Africa: burden, risk factors and outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(17):10537.
31. McKinnon B, Yang S, Kramer MS, Bushnik T, Sheppard AJ, Kaufman JS. Comparison of black–white disparities in preterm birth between Canada and the United States. *Can Med Assoc J*. 2016;188(1):E19–26.
32. Montoya-Williams D, Williamson VG, Cardel M, Fuentes-Afflick E, Maldonado-Molina M, Thompson L. The hispanic/latinx perinatal paradox in the United States: a scoping review and recommendations to guide future research. *J Immigr Minor Health*. 2021;23(5):1078–91.

33. Alonso BD, Silva FMB da, Latorre M do RD de O, Diniz CSG, Bick D. Caesarean birth rates in public and privately funded hospitals: a cross-sectional study. *Rev Saúde Pública*. 2017;51:101.
34. Diniz CSG, Miranda MJ de, Reis-Queiroz J, Queiroz MR, Salgado HDO. Why do women in the private sector have shorter pregnancies in Brazil? Left shift of gestational age, caesarean section and inversion of the expected disparity. *J Hum Growth Dev*. 2016 Apr 28;26(1):33.
35. McArdle HJ, Gambling L. Mechanisms and pathways of critical windows of development. in: *nutrition and development: short- and long-term consequences for health* [Internet]. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd.,; 2013 [cited 2019 Nov 22]. p. 75–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118782972.ch4>
36. Lavoie JC, Mohamed I. Bronchopulmonary dysplasia: the role of oxidative stress. In: Irusen E, editor. *Lung diseases - selected state of the art reviews* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2022 Oct 22]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lung-diseases-selected-state-of-the-art-reviews/bronchopulmonary-dysplasia-the-role-of-oxidative-stress>
37. Shennan AT, Dunn MS, Ohlsson A, Lennox K, Hoskins EM. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics*. 1988;82(4):527–32.
38. Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Oxygen and parenteral nutrition two main oxidants for extremely preterm infants: “It all adds up.” *J Neonatal-Perinat Med*. 2015;8(3):189–97.
39. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*. 1981;256(21):10986–92.
40. Shew SB, Keshen TH, Jahoor F, Jaksic T. Assessment of cysteine synthesis in very low–birth weight neonates using a [¹³C₆]glucose tracer. *J Pediatr Surg*. 2005;40(1):52–6.
41. Lavoie JC, Rouleau T, Truttmann AC, Chessex P. Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic Res*. 2002;36(8):811–7.
42. Alvira CM, Morty RE. Can we understand the pathobiology of bronchopulmonary dysplasia? *J Pediatr*. 2017;190:27–37.

43. Cui TX, Brady AE, Fulton CT, Zhang YJ, Rosenbloom LM, Goldsmith AM, et al. CCR2 mediates chronic LPS-induced pulmonary inflammation and hypoalveolarization in a murine model of bronchopulmonary dysplasia. *Front Immunol.* 2020;11:579628.
44. Chessex P, Laborie S, Nasef N, Masse B, Lavoie JC. Shielding parenteral nutrition from light improves survival rate in premature infants. *J Parenter Enter Nutr.* 2017;41(3):378–83.
45. Elremaly W, Mohamed I, Mialet-Marty T, Rouleau T, Lavoie JC. Ascorbylperoxide from parenteral nutrition induces an increase of redox potential of glutathione and loss of alveoli in newborn guinea pig lungs. *Redox Biol.* 2014;2(1):725–31.
46. Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition is associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely preterm infants. *J Parenter Enter Nutr.* 2017;41(6):1023–9.
47. Stoll B, Horst DA, Cui L, Chang X, Ellis KJ, Hadsell DL, et al. Chronic parenteral nutrition induces hepatic inflammation, steatosis, and insulin resistance in neonatal pigs. *J Nutr.* 2010;140(12):2193–200.
48. Guglielmi FW, Regano N, Mazzuoli S, Fregnan S, Leogrande G, Guglielmi A, et al. Cholestasis induced by total parenteral nutrition. *Clin Liver Dis.* 2008;12(1):97–110.
49. Van Noorden CJF, Frederiks WM, Aronson DC, Marx F, Bosch K, Jonges GN, et al. Changes in the acinar distribution of some enzymes involved in carbohydrate metabolism in rat liver parenchyma after experimentally induced cholestasis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1986;52(1):501–11.
50. Breij LM, Kerkhof GF, Hokken-Koelega ACS. Risk for nonalcoholic fatty liver disease in young adults born preterm. *Horm Res Paediatr.* 2015;84(3):199–205.
51. Hovi P, Vohr B, Ment LR, Doyle LW, McGarvey L, Morrison KM, et al. Blood pressure in young adults born at very low birth weight: adults born preterm international collaboration. *Hypertension.* 2016;68(4):880–7.
52. Bui DS, Perret JL, Walters EH, Lodge CJ, Bowatte G, Hamilton GS, et al. Association between very to moderate preterm births, lung function deficits, and COPD at age 53 years: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Respir Med.* 2022;10(5):478–84.

53. Mowitz ME, Gao W, Sipsma H, Zuckerman P, Wong H, Ayyagari R, et al. Long-term burden of respiratory complications associated with extreme prematurity: An analysis of US Medicaid claims. *Pediatr Neonatol*. 2022;63(5):503–11.
54. Broström EB, Akre O, Katz-Salamon M, Jaraj D, Kaijser M. Obstructive pulmonary disease in old age among individuals born preterm. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(1):79–85.
55. Kajantie E, Strang-Karlsson S, Evensen KAI, Haaramo P. Adult outcomes of being born late preterm or early term – What do we know? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2019;24(1):66–83.
56. Nuyt AM, Lavoie JC, Mohamed I, Paquette K, Luu TM. Adult consequences of extremely preterm birth: cardiovascular and metabolic diseases risk factors, mechanisms, and prevention avenues. *Clin Perinatol*. 2017;44(2):315–32.
57. Luu TM, Rehman Mian MO, Nuyt AM. Long-Term Impact of preterm birth: neurodevelopmental and physical health outcomes. *Clin Perinatol*. 2017;44(2):305–14.
58. Butte NF, Lopez-Alarcon MG, Garza C. Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. Geneva: World Health Organization; 2002.
59. Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. Cochrane Pregnancy and Childbirth Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2022 Oct 24];2012(8). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003517.pub2>
60. Sankar MJ, Sinha B, Chowdhury R, Bhandari N, Taneja S, Martines J, et al. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015;104:3–13.
61. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(1): 49–74.
62. Bode L, McGuire M, Rodriguez JM, Geddes DT, Hassiotou F, Hartmann PE, et al. It's alive: microbes and cells in human milk and their potential benefits to mother and infant. *Adv Nutr*. 2014;5(5):571–3.
63. Milsom SR, Blum WF, Gunn AJ. Temporal changes in insulin-like growth factors I and II and in insulin-like growth factor binding proteins 1, 2, and 3 in human milk. *Horm Res*. 2008;69(5):307–11.

64. Savino F, Petrucci E, Lupica MM, Nanni GE, Oggero R. Assay of ghrelin concentration in infant formulas and breast milk. *World J Gastroenterol.* 2011;17(15):1971–5.
65. Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition.* 2013;29(1):195–202.
66. Lau C. Development of suck and swallow mechanisms in infants. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(Suppl. 5):7–14.
67. Berseth CL. Gastrointestinal motility in the neonate. *Clin Perinatol.* 1996;23(2):179–90.
68. Dudrick SJ, Wilmore DW, Vars HM, Rhoads JE. Long-term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance. *Surgery.* 1968;64(1):134–42.
69. Coran AG. Total intravenous feeding of infants and children without the use of a central venous catheter. *Ann Surg.* 1974;179(4):445–9.
70. Quigley EMM, Marsh MN, Shaffer JL, Markin RS. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology.* 1993;104(1):286–301.
71. Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F, St.-Louis P, et al. Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41(1):108–14.
72. Helbock HJ, Motchnik PA, Ames BN. Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants. *Pediatrics.* 1993;91(1 I):83–7.
73. Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics.* 1997;99(3).
74. Brawley V, Bhatia J, Karp WB. Hydrogen peroxide generation in a model paediatric parenteral amino acid solution. *Clin Sci.* 1993;85(6):709–12.
75. Grand A, Jalabert A, Mercier G, Florent M, Hansel-Esteller S, Cambonie G, et al. Influence of vitamins, trace elements, and iron on lipid peroxidation reactions in all-in-one admixtures for neonatal parenteral nutrition. *J Parenter Enter Nutr.* 2011;35(4):505–10.

76. Knafo L, Chessex P, Rouleau T, Lavoie JC. Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin Chem*. 2005;51(8):1462–71.
77. Maghdessian R, Côté F, Rouleau T, Ouadda ABD, Levy É, Lavoie JC. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the lipid metabolism in newborn guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(1):278–84.
78. Robinson DT, Ayers P, Fleming B, Gura KM, Gutsul L, Michalski A, et al. Recommendations for photoprotection of parenteral nutrition for premature infants: An ASPEN position paper. *Nutr Clin Pract*. 2021;36(5):927–41.
79. Puntis Jwl, Hojsak I, Ksiazek J, Braegger C, Bronsky J, Cai W, et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Organisational aspects. *Clin Nutr*. 2018;37(6):2392–400.
80. Lavoie JC, Chessex P, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J. Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs. *Clin Nutr*. 2007;26(3):341–7.
81. Mungala Lengo A, Guiraut C, Mohamed I, Lavoie JC. Relationship between redox potential of glutathione and DNA methylation level in liver of newborn guinea pigs. *Epigenetics*. 2020;1–13.
82. Khashu M, Harrison A, Lalari V, Lavoie JC, Chessex P. Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of blood glucose and triglyceride levels in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2009;94(2):111–5.
83. Greene HL, Hambidge KM, Schanler R, Tsang RC. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr*. 1988;48(5):1324–42.
84. Moore MC, Greene HL, Phillips B, Franck L, Shulman RJ, Murrell JE, et al. Evaluation of a pediatric multiple vitamin preparation for total parenteral nutrition in infants and children i. blood levels of water-soluble vitamins. *Pediatrics*. 1986;77(4):530–8.

85. Bronsky J, Campoy C, Braegger C, Braegger C, Bronsky J, Cai W, et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Vitamins. *Clin Nutr.* 2018;37(6):2366–78.
86. Bartholomew M. James Lind's Treatise of the Scurvy (1753). *Postgrad Med J.* 2002;78(925):695–6.
87. Lind. A treatise of the scurvy : in three parts, containing an inquiry into the nature, causes, and cure, of that disease, together with a critical and chronological view of what has been published on the subject / by James Lind. London: A. Millar; 1753.
88. Zilva SS. The non-specificity of the phenolindophenol reducing capacity of lemon juice and its fractions as a measure of their antiscorbutic activity. *Biochem J.* 1932;26(5):1624–7.
89. Johnston CS, Steinberg FM, Rucker RB. Ascorbic acid. In: *Handbook of vitamins.* CRC Press; 2013.
90. Lachapelle MY, Drouin G. Inactivation dates of the human and guinea pig vitamin C genes. *Genetica.* 2011;139(2):199–207.
91. Cahill L, Corey PN, El-Sohemy A. Vitamin C deficiency in a population of young canadian adults. *Am J Epidemiol.* 2009;170(4):464–71.
92. Schleicher RL, Carroll MD, Ford ES, Lacher DA. Serum vitamin C and the prevalence of vitamin C deficiency in the United States: 2003-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Clin Nutr.* 2009;90(5):1252–63.
93. Márquez M, Rincón M, de Yépez CR. Niveles Séricos de Vitamina C en Adultos Jóvenes Consumidores Crónicos de Drogas de Abuso. *Investigación Clínica.* 2001;42(3):183-194.
94. Langlois K, Cooper M, Colapinto CK. Vitamin C status of canadian adults: Findings from the 2012/2013 canadian health measures survey. *Health Rep.* 2016;27(5):3–10.
95. Brassard D, Laramée C, Corneau L, Bégin C, Bélanger M, Bouchard L, et al. Poor adherence to dietary guidelines among french-speaking adults in the province of Quebec, Canada: The PREDISE Study. *Can J Cardiol.* 2018;34(12):1665–73.
96. Biddle SJH. Fruit and vegetable consumption, 2017. 2019;6.

97. Rehm CD, Peñalvo JL, Afshin A, Mozaffarian D. Dietary intake among US adults, 1999-2012. *JAMA*. 2016;315(23):2542.
98. Miller V, Mente A, Dehghan M, Rangarajan S, Zhang X, Swaminathan S, et al. Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*. 2017;390(10107):2037–49.
99. Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. The pharmacokinetics of vitamin C. *Nutrients*. 2019;11(10):2412.
100. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(2):535–43.
101. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1191–212.
102. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med*. 1986;314(14):892–902.
103. Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*. 2013;500(7461):222–6.
104. Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(1):71–9.
105. D’Aniello C, Habibi E, Cermola F, Paris D, Russo F, Fiorenzano A, et al. Vitamin C and L-proline antagonistic effects capture alternative states in the pluripotency continuum. *Stem Cell Rep*. 2017;8(1):1–10.
106. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, et al. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 2006;439(7078):811–6.
107. Wang T, Chen K, Zeng X, Yang J, Wu Y, Shi X, et al. The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*. 2011;9(6):575–87.

108. Miles SL, Fischer AP, Joshi SJ, Niles RM. Ascorbic acid and ascorbate-2-phosphate decrease HIF activity and malignant properties of human melanoma cells. *BMC Cancer*. 2015;15(1):867.
109. Semenza GL. HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 2001;107(1):1–3.
110. Cabelli DE, Bielski BHJ. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂- (hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *J Phys Chem*. 1983;87(10):1809–12.
111. Polle A, Junkermann W. Inhibition of apoplastic and symplastic peroxidase activity from norway spruce by the photooxidant hydroxymethyl hydroperoxide. *Plant Physiol*. 1994;104(2):617–21.
112. Anschau V, Ferrer-Sueta G, Aleixo-Silva RL, Bannitz Fernandes R, Tairum CA, Tonoli CCC, et al. Reduction of sulfenic acids by ascorbate in proteins, connecting thiol-dependent to alternative redox pathways. *Free Radic Biol Med*. 2020;156:207–16.
113. Jaffrey SR, Snyder SH. The Biotin Switch Method for the Detection of S -Nitrosylated Proteins. *Sci STKE [Internet]*. 2001;2001(86).
114. Figueiredo-Freitas C, Dulce RA, Foster MW, Liang J, Yamashita AMS, Lima-Rosa FL, et al. S-nitrosylation of sarcomeric proteins depresses myofilament Ca²⁺sensitivity in intact cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(13):1017–34.
115. Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications. *Cell*. 2022;185(14):2401–21.
116. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1991;273(3):601–4.
117. Shen J, Griffiths PT, Campbell SJ, Uttinger B, Kalberer M, Paulson SE. Ascorbate oxidation by iron, copper and reactive oxygen species: review, model development, and derivation of key rate constants. *Sci Rep*. 2021;11(1):7417.
118. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998;392(6676):559–559.

119. Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B, et al. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(1):293–8.
120. Ibeziako PA, Ette SI. Plasma ascorbic acid levels in nigerian mothers and newborn. *J Trop Pediatr.* 1981;27(5):263–6.
121. Kothari LK, Pramod J, Soni M, Sharma P. Ascorbic acid status in mothers and their newborn in semi-arid western India. *J Trop Pediatr.* 1991;37(2):90–1.
122. Berger TM, Rifai N, Avery ME, Frei B. Vitamin C in premature and full-term human neonates. *Redox Rep.* 1996;2(4):257–62.
123. Udipi SA, Kirksey A, West K, Giacoia G. Vitamin B6, vitamin C and folacin levels in milk from mothers of term and preterm infants during the neonatal period. *Am J Clin Nutr.* 1985;42(3):522–30.
124. Wollaston WH. On cystic oxide, a new species of urinary calculus. *Med Phys J.* 1811;25(145):254–9.
125. Werge MP, McCann A, Galsgaard ED, Holst D, Bugge A, Albrechtsen NJW, et al. The Role of the transsulfuration pathway in non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Med.* 2021;10(5):1081.
126. Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.* 1975;24(6):721–35.
127. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr.* 2006;136(6):1636S-1640S.
128. Liu C, Gamper H, Shtivelband S, Hauenstein S, Perona JJ, Hou YM. Kinetic quality control of anticodon recognition by a eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol.* 2007;367(4):1063–78.
129. Hansen JM. Spatial activities and induction of glutamate-cysteine ligase (GCL) in the postimplantation rat embryo and visceral yolk sac. *Toxicol Sci.* 2004;81(2):371–8.
130. Yamaguchi K, Hosokawa Y. Cysteine dioxygenase. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1987 [cited 2022 Nov 9]. p. 395–403.

131. Viña J, Vento M, García-Sala F, Puertes IR, Gascó E, Sastre J, et al. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(5):1067–9.
132. Lavoie JC, Chessex P. Development of glutathione synthesis and γ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(6):994–1001.
133. M.h M, D.k R, C.j R. Total parenteral nutrition in sick preterm infants: Effects of cysteine supplementation with nitrogen intakes of 240 and 400 mg/kg/day. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3(2).
134. Narkewicz MR, Caldwell S, Jones G. Cysteine supplementation and reduction of total parenteral nutrition- induced hepatic lipid accumulation in the weanling rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995;21(1).
135. Zlotkin SH, Bryan H, Anderson HG. Cysteine supplementation to cysteine-free intravenous feeding regimens in newborn infants. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(5).
136. Zlotkin SH, Anderson HG. Sulfur balances in intravenously fed infants: Effects of cysteine supplementation. *Am J Clin Nutr.* 1982;36(5).
137. C N Hales, D J Barker, P M Clark, L J Cox, C Fall, C Osmond PDW. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991;303:1019–22.
138. Barker DJP, Osmond C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *The Lancet.* 1986;327(8489):1077–81.
139. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* 2006;82(8):485–91.
140. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976;295(7):349–53.
141. Barker DJP, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002;31(6):1235–9.
142. Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia.* 2012;55(8):2085–8.

143. Mandy M, Nyirenda M. Developmental origins of health and disease: the relevance to developing nations. *Int Health*. 2018;10(2):66–70.
144. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008;359(1):61.
145. Tamayo-Uria I, Maitre L, Thomsen C, Nieuwenhuijsen MJ, Chatzi L, Siroux V, et al. The early-life exposome: Description and patterns in six European countries. *Environ Int*. 2019;123:189–200.
146. Lee TM, Zucker I. Vole infant development is influenced perinatally by maternal photoperiodic history. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1988;255(5):R831–8.
147. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. 2004;305:5.
148. Langley-Evans SC, Welham SJM, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci*. 1996;91(5):607–15.
149. Lisle SJM, Lewis RM, Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN, Forhead AJ. Effect of maternal iron restriction during pregnancy on renal morphology in the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2003;90(1):33–9.
150. Torrens C, Ethirajan P, Bruce KD, Cagampang FRA, Siow RCM, Hanson MA, et al. Interaction between maternal and offspring diet to impair vascular function and oxidative balance in high fat fed male mice. *PLoS ONE*. 2012;7(12).
151. Tain YL, Lin YJ, Sheen JM, Yu HR, Tiao MM, Chen CC, et al. High fat diets sex-specifically affect the renal transcriptome and program obesity, kidney injury, and hypertension in the offspring. *Nutrients*. 2017;9(4):357.
152. Ravizzoni Dartora D, Flahault A, Pontes CNR, He Y, Deprez A, Cloutier A, et al. Cardiac left ventricle mitochondrial dysfunction after neonatal exposure to hyperoxia: relevance for cardiomyopathy after preterm birth. *Hypertension*. 2021;79(3):1–13.
153. Langley-Evans SC, Welham SJM, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci*. 1999;64(11):965–74.

154. Parkinson JRC, Emsley R, Adkins JLT, Longford N, Ozanne SE, Holmes E, et al. Clinical and molecular evidence of accelerated ageing following very preterm birth. *Pediatr Res.* 2020;87(6):1005–10.
155. McMullen S, Langley-Evans SC, Gambling L, Lang C, Swali A, McArdle HJ. A common cause for a common phenotype: The gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Med Hypotheses.* 2012;78(1):88–94.
156. Legault LM, Doiron K, Lemieux A, Caron M, Chan D, Lopes FL, et al. Developmental genome-wide DNA methylation asymmetry between mouse placenta and embryo. *Epigenetics.* 2020;1–16.
157. Huyard F, Zydorczyk C, Castro MM, Cloutier A, Bertagnolli M, Sartelet H, et al. Remodeling of aorta extracellular matrix as a result of transient high oxygen exposure in newborn rats: Implication for arterial rigidity and hypertension risk. *PLoS ONE.* 2014;9(4):1–9.
158. Lavoie JC, Rouleau T, Chessex P. Interaction between ascorbate and light-exposed riboflavin induces lung remodeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(2):634–9.
159. Pradhan M, Estève PO, Hang GC, Samaranayake M, Kim GD, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry.* 2008;47(38):10000–9.
160. Yin R, Mao SQ, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic acid enhances tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc.* 2013;135(28):10396–403.
161. Delatte B, Jeschke J, Defrance M, Bachman M, Creppe C, Calonne E, et al. Genome-wide hydroxymethylcytosine pattern changes in response to oxidative stress. *Sci Rep.* 2015;5:1–10.
162. Niu Y, Desmarais TL, Tong Z, Yao Y, Costa M. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med.* 2015;82:22–8.
163. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, Leone S, Meneghini C, O’Callaghan N, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS ONE.* 2014;9(10).
164. Gelpi RJ, Boveris A, Poderoso JJ, editors. *Biochemistry of Oxidative Stress.* Vol. 25. 1986. 1058–1071 p.

165. Sies H. The Concept of Oxidative Stress After 30 Years. In: Gelpi RJ, Boveris A, Poderoso JJ, editors. *Biochemistry of Oxidative Stress* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 3–11.
166. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164–75.
167. Brack M, Brack O, Ménéz Y, Rousselot DB, Dreyfus G, Chapman MJC, et al. Distinct profiles of systemic biomarkers of oxidative stress in chronic human pathologies: Cardiovascular, psychiatric, neurodegenerative, rheumatic, infectious, neoplastic and endocrinological diseases. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013;04(03):331–9.
168. Hill KE, Montine TJ, Motley AK, Li X, May JM, Burk RF. Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(6):1484–8.
169. Wellen KE, Thompson CB. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol Cell.* 2010;40(2):323–32.
170. Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative stress related diseases in newborns. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
171. Huseby N erik, Sundkvist E, Svineng G. Glutathione and sulfur containing amino acids: antioxidant and conjugation activities. in: *glutathione and sulfur amino acids in human health and disease* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2019 Nov 22]. p. 91–120.
172. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613–9.
173. Skulachev VP, Bogachev AV, Kasparinsky FO. Structure of respiratory chains of prokaryotes and mitochondria of protozoa, plants, and fungi. in: *Principles of bioenergetics* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cited 2019 Nov 22]. p. 119–38.
174. Boveris A, Repetto MG. Mitochondria are the main cellular source of O₂⁻, H₂O₂ and oxidative stress. in: *Biochemistry of Oxidative Stress* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2019 Nov 22]. p. 23–35.

175. Go YM, Chandler JD, Jones DP. The cysteine proteome. *Free Radic Biol Med.* 2015;84:227–45.
176. Qiang Ma. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;(1):401–26.
177. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Part B):108–46.
178. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(8):2335–81.
179. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol.* 2016;10:191–9.
180. Chang S, Jiang X, Zhao C, Lee C, Ferriero DM. Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1 α protein expression and induces preconditioning protection against ischemia in primary cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2008;441(1):134–8.
181. Scirè A, Cianfruglia L, Minnelli C, Bartolini D, Torquato P, Principato G, et al. Glutathione compartmentalization and its role in glutathionylation and other regulatory processes of cellular pathways. *BioFactors.* 2019;45(2):152–68.
182. Mielal JJ, Gallogly MM, Qanungo S, Sabens EA, Shelton MD. Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(11):1941–88.
183. Kramer PA, Duan J, Gaffrey MJ, Shukla AK, Wang L, Bammler TK, et al. Fatiguing contractions increase protein S-glutathionylation occupancy in mouse skeletal muscle. *Redox Biol.* 2018;17:367–76.
184. Mailloux RJ, Jin X, Willmore WG. Redox regulation of mitochondrial function with emphasis on cysteine oxidation reactions. *Redox Biol.* 2014;2(1):123–39.

185. Gill RM, O'Brien M, Young A, Gardiner D, Mailloux RJ. Protein S-glutathionylation lowers superoxide/hydrogen peroxide release from skeletal muscle mitochondria through modification of complex I and inhibition of pyruvate uptake. *PLoS ONE*. 2018;13(2).
186. Blanchard CZ, Waldrop GL. Overexpression and kinetic characterization of the carboxyltransferase component of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1998;273(30):19140–5.
187. Rao RK, Clayton LW. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(1):610–6.
188. Gilbert HF. Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1982;257(20):12086–91.
189. Tippett PS, Neet KE. Interconversions between different sulfhydryl-related kinetic states in glucokinase. *Arch Biochem Biophys*. 1983;222(1):285–98.
190. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28(3):485–96.
191. García-Santamarina S, Boronat S, Hidalgo E. Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Biochemistry*. 2014;53(16):2560–80.
192. Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med*. 2015;80:148–57.
193. Sakai J, Li J, Subramanian KK, Mondal S, Bajrami B, Hattori H, et al. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity*. 2012;37(6):1037–49.
194. Dong K, Wu M, Liu X, Huang Y, Zhang D, Wang Y, et al. Glutaredoxins concomitant with optimal ROS activate AMPK through S-glutathionylation to improve glucose metabolism in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2016;101:334–47.
195. Martensson J, Han J, Griffith OW, Meister A. Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(1):317–21.
196. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9397–400.

197. May JM, Qu ZC, Neel DR, Li X. Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2003;1640(2–3):153–61.
198. Park JB, Levine M. Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils: identification as glutaredoxin. *Biochem J.* 1996;315(3):931–8.
199. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177–97.
200. Goedeke L, Bates J, Vatner DF, Perry RJ, Wang T, Ramirez R, et al. Acetyl-CoA Carboxylase inhibition reverses NAFLD and hepatic insulin resistance but promotes hypertriglyceridemia in rodents. *Hepatology.* 2018;68(6):2197–211.
201. Kim CW, Addy C, Kusunoki J, Anderson NN, Deja S, Fu X, et al. Acetyl CoA Carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: a bedside to bench investigation. *Cell Metab.* 2017;26(2):394-406.e6.
202. Peter A, Stefan N, Cegan A, Walenta M, Wagner S, Königsrainer A, et al. Hepatic glucokinase expression is associated with lipogenesis and fatty liver in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1126–30.
203. Nelson ME, Lahiri S, Chow JDY, Byrne FL, Hargett SR, Breen DS, et al. Inhibition of hepatic lipogenesis enhances liver tumorigenesis by increasing antioxidant defence and promoting cell survival. *Nat Commun.* 2017;8:1–11.
204. Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Takahashi K, Omori K, et al. The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice. *Metabolism.* 2018;85:48–58.
205. Fujieda H, Kogami M, Sakairi M, Kato N, Makino M, Takahashi N, et al. Discovery of a potent glucokinase activator with a favorable liver and pancreas distribution pattern for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Eur J Med Chem.* 2018;156:269–94.
206. Nicolau J, Souza DN, Nunez-Burgos G. Regulation of phosphofructokinase-1 on submandibular salivary glands of rats after isoproterenol administration. *Arch Physiol Biochem.* 2000 Jan108(5):437–43.
207. Oria-Hernández J, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Ramírez-Silva L. Pyruvate Kinase revisited. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37924–9.

208. Massa ML, Gagliardino JJ, Francini F. Liver glucokinase: An overview on the regulatory mechanisms of its activity. *IUBMB Life*. 2011;63(1):1–6.
209. Murray RK, Davis JC. Metabolism of Glycogen. In: Rodwell V, editor. *Harper's Illustrated Biochemistry* [Internet]. McGraw-Hill Medical; 2018 [cited 2019 Nov 22]. p. 136–50.
210. Liu X, Wang H, Liang X, Roberts MS. Hepatic metabolism in liver health and disease. In: *Liver pathophysiology: therapies and antioxidants*. Elsevier; 2017. p. 391–400.
211. Hellerstein MK. Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu Rev Nutr*. 1996;16(1):523–57.
212. Bleier L, Dröse S. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2013;1827(11–12):1320–31.
213. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(2):223–7.
214. Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(11):678–89.
215. Vagelos, P.R., Alberts, A.W. and Martin DB. Studies on the mechanism of activation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase by citrate. *J Biol Chem*. 1963;238(2).
216. Rous S, Luthi L, Favarger P. Role of ATP in the inhibition of lipogenesis in fasted animals. *Lipids*. 1967;2(1):60–3.
217. Jin ES, Lee MH, Murphy RE, Malloy CR. Pentose phosphate pathway activity parallels lipogenesis but not antioxidant processes in rat liver. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2018;314(6):E543–51.
218. Jin L, Guo T, Li Z, Lei Z, Li H, Mao Y, et al. Role of glucokinase in the subcellular localization of glucokinase regulatory protein. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):7377–93.
219. Baltrusch S, Lenzen S, Okar DA, Lange AJ, Tiedge M. Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43915–23.
220. Depre C, Rider MH, Veitch K, Hue L. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *J Biol Chem*. 1993;268(18):13274–9.

221. Van Schaftingen E, Hue L, Hers HG. Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem J.* 1980;192(3):897–901.
222. Pongvarin N, Chang B, Imamura M, Chen J, Moolsuwan K, Sae-Lee C, et al. Genome-wide analysis of ChREBP binding sites on male mouse liver and white adipose chromatin. *Endocrinology.* 2015;156(6):1982–94.
223. Ortega-Prieto P, Postic C. Carbohydrate sensing through the transcription factor ChREBP. *Front Genet.* 2019;10(JUN):1–9.
224. Magaña MM, Osborne TF. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32689–94.
225. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(24):13710–5.
226. Dentin R, Tomas-Cobos L, Foufelle F, Leopold J, Girard J, Postic C, et al. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol.* 2012;56(1):199–209.
227. Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J.* 2006;400(1):179–88.
228. Bakan I, Laplante M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr Opin Lipidol.* 2012;23(3):226–34.
229. Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol.* 2002;92(6):2475–82.
230. Fang C, Pan J, Qu N, Lei Y, Han J, Zhang J, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease. *Front Physiol.* 2022;13:970292.

231. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E671–8.
232. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, et al. Akt stimulates hepatic srebp1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011;14(1):21–32.
233. Jones PL, Veenstra GJC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187–91.
234. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D’Souza C, Fouse SD, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature.* 2010;466(7303):253–7.
235. Ko M, An J, Bandukwala HS, Chavez L, Äijö T, Pastor WA, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. 2015 p. 790–5.
236. Pera MF. Epigenetics, vitamin supplements and cellular reprogramming. *Nat Genet.* 2013;45(12):1412–3.
237. Hedman ÅK, Zilmer M, Sundström J, Lind L, Ingelsson E. DNA methylation patterns associated with oxidative stress in an ageing population. *BMC Med Genomics.* 2016;9(1):1–12.
238. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015;13(1):1–8.
239. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001;293(5532):1089–93.
240. Kaelin WG, McKnight SL. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell.* 2013;153(1):56–69.
241. Li S, Ye Z, Mather KA, Nguyen TL, Dite GS, Armstrong NJ, et al. Early life affects late-life health through determining DNA methylation across the lifespan: A twin study. *eBioMedicine.* 2022;77:103927.
242. Hannon E, Knox O, Sugden K, Burrage J, Wong CCY, Belsky DW, et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. Greally JM, editor. *PLOS Genet.* 2018;14(8):e1007544.

243. Bowman A, Peterson KE, Dolinoy DC, Meeker JD, Sánchez BN, Mercado-Garcia A, et al. phthalate exposures, DNA methylation and adiposity in mexican children through adolescence. *Front Public Health*. 2019;7:162.
244. Zheng Y, Joyce BT, Hwang SJ, Ma J, Liu L, Allen NB, et al. Association of cardiovascular health through young adulthood with genome-wide DNA methylation patterns in midlife: The CARDIA study. *Circulation*. 2022;146(2):94–109.
245. Deshpande SS, Nemani H, Arumugam G, Ravichandran A, Balasinor NH. High-fat diet-induced and genetically inherited obesity differentially alters DNA methylation profile in the germline of adult male rats. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):179.
246. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet*. 2009;18(21):4046–53.
247. Cole E, Brown TA, Pinkerton KE, Postma B, Malany K, Yang M, et al. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke is associated with changes in DNA methylation that precede the adult onset of lung disease in a mouse model. *Inhal Toxicol*. 2017;29(10):435–42.
248. Keller SM, Doherty TS, Roth TL. Pharmacological manipulation of DNA methylation in adult female rats normalizes behavioral consequences of early-life maltreatment. *Front Behav Neurosci*. 2018;12:126.
249. Pajares MA, Durán C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM. Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem*. 1992;267(25):17598–605.
250. Pérez-Mato I, Castro C, Ruiz FA, Corrales FJ, Mato JM. Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17075–9.
251. Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J. Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4285–91.
252. Bellizzi D, Daquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*. 2012;4(1):17–27.

253. O'Connor KM, Das AB, Winterbourn CC, Hampton MB. Inhibition of DNA methylation in proliferating human lymphoma cells by immune cell oxidants. *J Biol Chem.* 2020;295(23):7839–48.
254. Carey BW, Finley LWS, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2015;518(7539):413–6.
255. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2008;659(1–2):40–8.
256. Tu BP, Mohler RE, Liu JC, Dombek KM, Young ET, Synovec RE, et al. Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):16886–91.
257. Donohoe DR, Bultman SJ. Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J Cell Physiol.* 2012;227(9):3169–77.
258. Gensous N, Franceschi C, Santoro A, Milazzo M, Garagnani P, Bacalini MG. The impact of caloric restriction on the epigenetic signatures of aging. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
259. Faulkner A, Jones CT. Metabolite concentrations in the liver of the adult and developing guinea pig and the control of glycolysis in vivo. *Arch Biochem Biophys.* 1976;176(1):171–80.
260. Roth U, Jungermann K, Kietzmann T. Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes. *Biol Chem [Internet].* 2004 Jan 13 [cited 2022 Oct 25];385(3–4).
261. Nau PN, Van Natta T, Ralphe JC, Teneyck CJ, Bedell KA, Caldarone CA, et al. Metabolic adaptation of the fetal and postnatal ovine heart: regulatory role of hypoxia-inducible factors and nuclear respiratory factor-1. *Pediatr Res.* 2002;52(2):269–78.
262. Valcarce C, Izquierdo JM, Chamorro M, Cuezva JM. Mammalian adaptation to extrauterine environment: Mitochondrial functional impairment caused by prematurity. *Biochem J.* 1994;303(3):855–62.
263. Turcot V, Rouleau T, Tsopmo A, Germain N, Potvin L, Nuyt AM, et al. Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(3):275–82.

264. Rook D, Te Braake FWJ, Schierbeek H, Longini M, Buonocore G, Van Goudoever JB. Glutathione synthesis rates in early postnatal life. *Pediatr Res.* 2010;67(4):407–11.
265. Elremaly W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Adding glutathione to parenteral nutrition prevents alveolar loss in newborn Guinea pig. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:274–81.
266. Morin G, Guiraut C, Perez Marcogliese M, Mohamed I, Lavoie JC. Glutathione supplementation of parenteral nutrition prevents oxidative stress and sustains protein synthesis in guinea pig model. *Nutrients.* 2019;11(9):2063.
267. Kleiber N, Chessex P, Rouleau T, Nuyt AM, Perreault M, Lavoie JC. Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition. *Pediatr Res.* 2010;68(3):188–92.
268. Elremaly W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Impact of glutathione supplementation of parenteral nutrition on hepatic methionine adenosyltransferase activity. *Redox Biol.* 2016;8:18–23.
269. Yara S, Levy E, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Total parenteral nutrition induces sustained hypomethylation of DNA in newborn guinea pigs. *Pediatr Res.* 2013;73(5):592–5.
270. Reynaert NL, van der Vliet A, Guala AS, McGovern T, Hristova M, Pantano C, et al. Dynamic redox control of NF- κ B through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory κ B kinase β . *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(35):13086–91.
271. Klaus A, Zorman S, Berthier A, Polge C, Ramirez S, Michelland S, et al. Glutathione S-transferases interact with AMP-activated protein kinase: evidence for S-glutathionylation and activation in vitro. *PLoS ONE.* 2013;8(5):1–10.
272. Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Inhibition of hepatic methionine adenosyltransferase by peroxides contaminating parenteral nutrition leads to a lower level of glutathione in newborn Guinea pigs. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(12):2250–5.
273. Lavoie JC, Mohamed I, Teixeira V. Dose–response effects of glutathione supplement in parenteral nutrition on pulmonary oxidative stress and alveolarization in newborn guinea pig. *Antioxidants.* 2022;11(10):1956.

274. Morrison JL, Botting KJ, Darby JRT, David AL, Dyson RM, Gatford KL, et al. Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol*. 2018;596(23):5535–69.
275. Chawla S, Jena S, Nayak S. The Laboratory Guinea Pig. In: Nagarajan P, Gudde R, Srinivasan R, editors. *Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2021 [cited 2023 Apr 27]. p. 239–51.
276. Sarr O, Yang K, Regnault TRH. In utero programming of later adiposity: The role of fetal growth restriction. *J Pregnancy* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jan 21];2012.
277. Crudo A, Petropoulos S, Moisiadis VG, Iqbal M, Kostaki A, Machnes Z, et al. Prenatal synthetic glucocorticoid treatment changes DNA methylation states in male organ systems: multigenerational effects. *Endocrinology*. 2012;153(7):3269–83.
278. Laborie S, Denis A, Dassieu G, Bedu A, Tourneux P, Pinquier D, et al. Shielding parenteral nutrition solutions from light. *J Parenter Enter Nutr*. 2015;39(6):729–37.
279. Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light. *J Pediatr*. 2000;136(5):628–32.
280. Dimova S, Hoet PHM, Dinsdale D, Nemery B. Acetaminophen decreases intracellular glutathione levels and modulates cytokine production in human alveolar macrophages and type II pneumocytes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(8):1727–37.
281. Raichani NE, Guiraut C, Morin G, Mohamed I, Lavoie J. Stability of glutathione added as a supplement to parenteral nutrition. *J Parenter Enter Nutr*. 2022;46(5):1080–7.
282. Balet A, Cardona D, Jane S, Molins-Pujol AM, Sanchez Quesada JL, Gich I, et al. Effects of multilayered bags vs ethylvinyl-acetate bags on oxidation of parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(2):85–91.
283. Ribeiro DO, Pinto DC, Lima LMT, Volpato NM, Cabral LM, de Sousa VP. Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. *Nutr J*. 2011;10(1):47.

284. Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30772–80.
285. Friel JK, Bessie JC, Belkhole SL, Edgecombe C, Steele-Rodway M, Downton G, et al. Thiamine, riboflavin, pyridoxine, and vitamin C status in premature infants receiving parenteral and enteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33(1):64–9.
286. Darlow BA. Vitamin C supplementation in very preterm infants: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(2):F117–22.
287. Nualart F, Castro T, Low M, Henríquez JP, Oyarce K, Cisternas P, et al. Dynamic expression of the sodium-vitamin C co-transporters, SVCT1 and SVCT2, during perinatal kidney development. *Histochem Cell Biol.* 2013;139(2):233–47.
288. Sandoval D, Ojeda J, Low M, Nualart F, Marcellini S, Osses N, et al. The vitamin C transporter SVCT2 is down-regulated during postnatal development of slow skeletal muscles. *Histochem Cell Biol.* 2013;139(6):887–94.
289. Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids.* 2008;34(3):347–55.
290. Torrence ME, MacArthur MR, Hosios AM, Valvezan AJ, Asara JM, Mitchell JR, et al. The mTORC1-mediated activation of ATF4 promotes protein and glutathione synthesis downstream of growth signals. *eLife.* 2021;1.
291. Rodríguez-Martínez S, Márquez R, Inácio Â, Galván I. Changes in melanocyte RNA and DNA methylation favour pheomelanin synthesis and may avoid systemic oxidative stress after dietary cysteine supplementation in birds. *Mol Ecol.* 2019;28(5):1030–42.
292. Miloudi K, Comte B, Rouleau T, Montoudis A, Levy E, Lavoie JC. The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr.* 2012;31(4):526–34.
293. Cumaoglu A, Arıcıoglu A, Karasu C. Redox status related activation of endoplasmic reticulum stress and apoptosis caused by 4-hydroxynonenal exposure in INS-1 cells. *Toxicol Mech Methods.* 2014;24(5):362–7.

294. Trus M, Zawalich K, Gaynor D, Matschinsky F. Hexokinase and glucokinase distribution in the liver lobule. *J Histochem Cytochem.* 1980;28(6):579–81.
295. Ellis PJ, Morris TJ, Skinner BM, Sargent CA, Vickers MH, Gluckman PD, et al. Thrifty metabolic programming in rats is induced by both maternal undernutrition and postnatal leptin treatment, but masked in the presence of both: implications for models of developmental programming. *BMC Genomics.* 2014;15(1):49.
296. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(19):8695–9.
297. Ronowska A, Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul-Hinc S, Klimaszewska-Łata J, Dyś A, et al. The regulatory effects of acetyl-CoA distribution in the healthy and diseased brain. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:169.
298. Ghosh A, Shcherbik N. Effects of oxidative stress on protein translation: implications for cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2661.
299. Chen MS, Wang SF, Hsu CY, Yin PH, Yeh TS, Lee HC, et al. CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2alpha-ATF4 pathway. *Oncotarget.* 2017;8(70):114588–602.
300. Carraro V, Combaret L, Coudy-Gandilhon C, Parry L, Averous J, Maurin AC, et al. Activation of the eIF2alpha-ATF4 pathway by chronic paracetamol treatment is prevented by dietary supplementation with cysteine. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13).
301. Zhang Y, Swanda RV, Nie L, Liu X, Wang C, Lee H, et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation. *Nat Commun.* 2021;12(1):1589.
302. Lee SW, Baek SM, Kang KK, Lee AR, Kim TU, Choi SK, et al. Vitamin C deficiency inhibits nonalcoholic fatty liver disease progression through impaired de novo lipogenesis. *Am J Pathol.* 2021;191(9):1550–63.
303. Okuno Y, Fukuhara A, Hashimoto E, Kobayashi H, Kobayashi S, Otsuki M, et al. Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway. *Diabetes.* 2018;67(6):1113–27.

304. Giudetti AM, Damiano F, Gnoni GV, Siculella L. Low level of hydrogen peroxide induces lipid synthesis in BRL-3A cells through a CAP-independent SREBP-1a activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(7):1419–26.
305. Sekiya M, Hiraishi A, Touyama M, Sakamoto K. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375(4):602–7.
306. Long W, Wu J, Shen G, Zhang H, Liu H, Xu Y, et al. Estrogen-related receptor participates in regulating glycolysis and influences embryonic development in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol.* 2020;29(2):160–9.
307. Beebe K, Robins MM, Hernandez EJ, Lam G, Horner MA, Thummel CS. *Drosophila* estrogen-related receptor directs a transcriptional switch that supports adult glycolysis and lipogenesis. *Genes Dev.* 2020;34(9–10):701–14.
308. Russ DW, Lanza IR, Rothman D, Kent-Braun JA. Sex differences in glycolysis during brief, intense isometric contractions. *Muscle Nerve.* 2005;32(5):647–55.
309. Lu Y, Tian N, Hu L, Meng J, Feng M, Zhu Y, et al. ER α down-regulates carbohydrate responsive element binding protein and decreases aerobic glycolysis in liver cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2021;25(7):3427–36.
310. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D’Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature.* 2004;430(6998):419–21.
311. Hanschmann EM, Berndt C, Hecker C, Garn H, Bertrams W, Lillig CH, et al. Glutaredoxin 2 reduces asthma-like acute airway inflammation in mice. *Front Immunol.* 2020;11:561724.
312. Nolin JD, Tully JE, Hoffman SM, Guala AS, van der Velden JL, Poynter ME, et al. The glutaredoxin/S-glutathionylation axis regulates interleukin-17A-induced proinflammatory responses in lung epithelial cells in association with S-glutathionylation of nuclear factor κ B family proteins. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:143–53.
313. Chia SB, Nolin JD, Aboushousha R, Erikson C, Irvin CG, Poynter ME, et al. Glutaredoxin deficiency promotes activation of the transforming growth factor beta pathway in airway epithelial cells, in association with fibrotic airway remodeling. *Redox Biol.* 2020;37:101720.

314. Mardones L, Zúñiga FA, Villagrán M, Sotomayor K, Mendoza P, Escobar D, et al. Essential role of intracellular glutathione in controlling ascorbic acid transporter expression and function in rat hepatocytes and hepatoma cells. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1874–87.
315. Bansal A, Simmons RA. Epigenetics and developmental origins of diabetes: Correlation or causation? *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2018;315(1):E15–28.
316. Chaveroux C, Lambert-Langlais S, Parry L, Carraro V, Jousse C, Maurin AC, et al. Identification of GCN2 as new redox regulator for oxidative stress prevention in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415(1):120–4.
317. Chandrasekaran A, Lee MY, Zhang X, Hasan S, Desta H, Tenenbaum SA, et al. Redox and mTOR-dependent regulation of plasma lamellar calcium influx controls the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Biol Med.* 2020;245(17):1560–70.
318. Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Yin J, Zhou H, et al. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. *Lab Invest.* 2010;90(5):762–73.
319. Aliou Y, Liao MC, Zhao XP, Chang SY, Chenier I, Ingelfinger JR, et al. Post-weaning high-fat diet accelerates kidney injury, but not hypertension programmed by maternal diabetes. *Pediatr Res.* 2016;79(3):416–24.
320. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function: Nutritional compromise, maternal care and offspring development. *J Physiol.* 2012;590(9):2167–80.
321. Liu S, Pi J, Zhang Q. Mathematical modeling reveals quantitative properties of KEAP1-NRF2 signaling. *Redox Biol.* 2021;47:102139.
322. Schleicher J, Dahmen U. Computational modeling of oxidative stress in fatty livers elucidates the underlying mechanism of the increased susceptibility to ischemia/reperfusion injury. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:511–22.