

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

L'effet à long terme de la nutrition parentérale totale néonatale sur le  
métabolisme énergétique

Par  
Niina Kleiber

Programme de Sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maîtrise (MSc) en Sciences biomédicales  
Option Générale

Août 2009

© Niina Kleiber, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé :  
L'effet à long terme de la nutrition parentérale totale néonatale sur le  
métabolisme énergétique

Présenté par :

Niina Kleiber

A été évalué par les personnes suivantes

Dr Michèle Brochu  
Président-rapporteur

Dr Anne-Monique Nuyt  
Directrice de recherche

Dr Jean-Claude Lavoie  
Codirecteur

Dr Philippe Chessex  
Membres du jury

## Résumé

En raison de la prématurité ou de conditions médicales, un grand nombre de nouveau-nés reçoivent de la nutrition parentérale totale (NPT) en période néonatale. Durant la période d'administration, l'impact métabolique et les effets néfastes de la NPT et celui de son administration avec des sacs exposés à la lumière sont en grande partie connus. Il est admis que des évènements se produisant in utero ou en période néonatale entraînent des modifications métaboliques chez l'adulte. Mais on ignore si la nutrition parentérale possède des effets à long terme.

Le but de notre étude est donc d'évaluer l'effet d'une courte période néonatale de NPT sur le métabolisme énergétique de l'adulte.

De J3 à J7, des cochons d'Inde sont nourris par NPT dont le sac et la tubulure sont exposés ou protégés de la lumière et sont comparés à des animaux nourris par voie entérale. Après J7, les trois groupes sont nourris de la même façon, par voie entérale exclusivement. Les animaux nourris par NPT montrent une prise pondérale inférieure, un catabolisme plus marqué et des concentrations de substrats énergétiques abaissées (glucose, cholestérol et triglycérides). À 3 mois, le foie des groupes NPT montre des concentrations de triglycérides et de cholestérol abaissées et des changements d'activité enzymatique. La photoprotection de la NPT néonatale diminue la prise pondérale et les concentrations de triglycérides et de cholestérol hépatiques.

Notre étude est la première à explorer l'effet à long terme de la NPT néonatale. Elle ouvre la porte à des études humaines qui permettront, nous l'espérons, d'améliorer la prise en charge des nouveau-nés les plus fragiles et les plus immatures.

Mot-clés : nouveau-né, hyperalimentation intraveineuse, programmation, photoprotection, triglycérides, foie, croissance, alimentation entérale

**Abstract**

Because of prematurity or other medical and surgical conditions, many infants require total parenteral nutrition (TPN) during the neonatal period. The metabolic impacts and adverse effects that can be observed during TPN administration and secondary to exposure of the TPN solutions to light have been studied. The concept that fetal and early life events result in permanent metabolic alterations is now accepted. However, long term consequences of neonatal TPN administration are unknown.

The aim of the current study was to examine long term effects of a short neonatal period of total parenteral nutrition on adult energy metabolism.

Between their third and their seventh day of life, guinea pigs received light-exposed or light-protected TPN and were compared to animals who were enterally fed. After day 7, all three groups received a similar nutrient intake provided exclusively enterally. The animals who received TPN display lower weight gain, enhanced catabolic state and have lower concentrations of energy substrates such as glucose, cholesterol and triglycerides. At 3 month, their liver has lower concentrations of cholesterol and triglycerides and display changes in enzymatic activity. Photoprotection of TPN lowers weight gain and liver concentrations of cholesterol and triglycerides.

To our knowledge, our study is the first to explore long term effects of neonatal TPN. It opens the door to human studies that will, hopefully, improve the care of this population of fragile and immature newborns.

Keywords : total parenteral nutrition, energy metabolism, growth, programming, fatty acids, liver, photoprotection, newborn

**Liste des abréviations**

ACC	AcétylCoA carboxylase
Ach	Acétylcholine
AG	Acides gras libres
AMPK	protéine kinase AMP dépendante
CPT-1	Carnitine palmitoyl transférase -1
DEHP	Di-ethylhexyl-phthalate
GH	Hormone de croissance
GK	Glucokinase
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
IMC	Index de masse corporelle
LDN	Lipogenèse de novo
MVP	Préparations multivitaminées
NEC	Entérocolite nécrosante
NPT	Nutrition parentérale totale
NPT EL	Nutrition parentérale totale exposée à la lumière
NPT PL	Nutrition parentérale totale protégée de la lumière
PFK	Phosphofructokinase
RCIU	Retard de croissance intrautérin
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SM	Syndrome métabolique
T2D	Diabète de type 2
TG	Triglycérides
TGH	Triacylglycérol hydrolase

## Remerciements

**À Dr Anne-Monique Nuyt**, pour avoir cru en moi, m'avoir accompagnée et soutenue. Sans vous je ne serais probablement pas où je suis ni si heureuse d'y être.

**À Dr Jean-Claude Lavoie**, pour votre disponibilité, votre sens critique, votre gentillesse et votre honnêteté.

**À Dr Michèle Brochu**, pour la qualité de l'enseignement que vous m'avez offert, pour votre rigueur et votre dévouement.

**À Thérèse Rouleau**, pour avoir effectué avec soins l'entier des dosages enzymatiques et pour vos explications claires et rigoureuses.

**Au personnel de l'animalerie**, pour son travail, son souci du bien-être des animaux et son soutien.

## Table des matières

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LA NUTRITION PARENTÉRAL TOTALE (NPT) EN NÉONATOLOGIE</b>	<b>1</b>
1.1.1 DÉFINITION ET INDICATION DE LA NPT	1
1.1.2 COMPLICATIONS DE LA NPT	1
<b>1.2 L'EXPOSITION À LA LUMIÈRE DE LA NUTRITION PARENTÉRALE TOTALE</b>	<b>3</b>
1.2.1 LES RADICAUX RÉACTIFS, ÉQUILIBRE REDOX ET STRESS OXYDANT	3
1.2.2 LE STRESS OXYDANT CHEZ LE NOUVEAU-NÉ	6
1.2.3 LE CONTENU EN PEROXYDES DE LA NPT	7
1.2.4 LES CONSÉQUENCES CLINIQUES DÉLÉTÈRES DE L'EXPOSITION DE LA NPT À LA LUMIÈRE À COURT TERME	8
1.2.5 LES CONSÉQUENCES À COURT TERME DE L'EXPOSITION DE LA NPT À LA LUMIÈRE SUR LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE	10
<b>1.3. LA PROGRAMMATION DES MALADIES DE L'ADULTE</b>	<b>12</b>
1.3.1 LES MÉCANISMES DE LA PROGRAMMATION DÉVELOPPEMENTALE	13
1.3.2 LA CROISSANCE ACCÉLÉRÉE ET LA NUTRITION POSTNATALE	15
1.3.3 PROGRAMMATION PAR LE STRESS OXYDANT	16
<b>2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE</b>	<b>18</b>
<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>19</b>
<b>3.1 LE COCHON D'INDE COMME MODÈLE</b>	<b>19</b>
<b>3.2 LES ANIMAUX</b>	<b>19</b>
<b>3.3 ÉVOLUTION DU POIDS</b>	<b>21</b>
<b>3.4 DOSAGE DES TRIGLYCÉRIDES ET DU CHOLESTÉROL SANGUIN</b>	<b>21</b>
<b>3.5 DOSAGE DES TRIGLYCÉRIDES ET DU CHOLESTÉROL HÉPATIQUES</b>	<b>22</b>
<b>3.6 MÉTABOLISME DES GLUCIDES</b>	<b>22</b>
<b>3.7 MESURE DU MOUVEMENT</b>	<b>22</b>
<b>3.8 MESURE DE L'ACTIVITÉ DES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE</b>	<b>23</b>
3.8.1 L'ACTIVITÉ DE LA TGH (TRIACYL GLYCÉROL HYDROXYLASE)	23
3.8.2 L'ACTIVITÉ DE L'AMPK ET DE L'ACC (L'ACÉTYL-CoA CARBOXYLASE)	24
3.8.3 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA GLUCOKINASE	25
3.8.4 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHOFRUCTOKINASE-1	26
<b>3.9 ANALYSES STATISTIQUES</b>	<b>26</b>
<b>4. LES RÉSULTATS</b>	<b>27</b>
<b>4.1 LE POIDS</b>	<b>27</b>
<b>4.2 LE NOMBRE DE MOUVEMENTS PAR HEURE</b>	<b>27</b>
<b>4.3 LES TRIGLYCÉRIDES PLASMATIQUES</b>	<b>28</b>
<b>4.4 LE CHOLESTÉROL PLASMATIQUE</b>	<b>29</b>

<b>4.5 LA GLYCÉMIE.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 LES TRIGLYCÉRIDES ET LE CHOLESTÉROL HÉPATIQUES .....</b>	<b>31</b>
<b>4.7 LES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES .....</b>	<b>32</b>
<b><u>5. DISCUSSION .....</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b>5.1 L'EFFET DE LA NUTRITION PARENTÉRALE : LES GROUPES NPT COMPARÉS AU GROUPE TÉMOIN .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 L'EFFET DE L'EXPOSITION OU DE LA PROTECTION DE LA LUMIÈRE SUR LES SOLUTIONS DE NPT: LES GROUPES NPT COMPARÉS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 LIMITATIONS DE NOTRE ÉTUDE .....</b>	<b>44</b>
<b><u>6. CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>46</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE.....</u></b>	<b><u>47</u></b>



## **1. Introduction**

La nutrition parentérale totale (NPT) est administrée tous les jours dans les unités de néonatalogie sans qu'on ne protège son contenu de la lumière. Pourtant il est bien documenté que la lumière interfère sur le contenu de la NPT et que ces changements de contenu ont un effet sur la santé des nouveau-nés durant la période d'infusion. Mais pourraient-ils également être responsables d'effets à long terme? En d'autres termes, pourraient-ils avoir des conséquences sur la santé de ces nouveau-nés une fois devenus adultes? Actuellement, bien que ces préparations alimentaires soient utilisées quotidiennement dans les unités de soins néonataux, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur leur effet à long terme.

### **1.1 La nutrition parentéral totale (NPT) en néonatalogie**

#### **1.1.1 Définition et indication de la NPT**

La nutrition parentérale totale (TPN) est une administration intraveineuse de tous les nutriments nécessaires aux besoins métaboliques et à la croissance. Des acides aminés, des lipides, du glucose, des vitamines et des électrolytes sont administrés de manière à combler les besoins caloriques et nutritionnels.

La nutrition parentérale totale est réservée aux nouveau-nés chez qui une diète entérale adéquate est contre-indiquée. Il s'agit des nouveau-nés dont le poids de naissance est inférieur à 1500 grammes, des enfants présentant des troubles digestifs, infectieux ou respiratoires. Dès que l'état clinique et la maturité du tube digestif de l'enfant le permet, le relais est progressivement effectué vers la nutrition entérale.

#### **1.1.2 Complications de la NPT**

Deux types de risque sont inhérents à la NPT. Le premier est secondaire au matériel nécessaire à l'administration. Le second, auquel s'intéresse notre travail, est dû au contenu de la nutrition parentérale.

La voie d'administration implique une ponction et l'insertion d'un cathéter. Des infections sont secondaires au bris de la barrière cutanée par le matériel de ponction et à la présence, dans les vaisseaux, d'une surface en silicone sur laquelle peuvent croître les germes (Yeung, Lee, Huang, & Wang, 1998). Le matériel peut également entraîner un traumatisme sur les structures vasculaires et la préparation qui devait être administrées

dans la veine est alors dispersée dans d'autres structures. Les conséquences de l'extravasation de la préparation de NPT suite à la rupture d'une structure vasculaire dépend de sa localisation. Par exemple, une extravasation dans les tissus cutanés peut être responsable de nécrose tissulaire et l'extravasation dans le péricarde peut mener à une tamponnade péricardique pouvant entraîner la mort (Ramasethu, 2008). Il y a également des risques de thrombose liés à la présence d'un corps étranger dans les vaisseaux et à des bris de l'endothélium stimulant la cascade de coagulation. Les cathéters sont d'ailleurs la principale cause de thrombose chez les nouveau-nés. En raison de l'importante morbidité et mortalité liée aux complications secondaires à la voie d'administration de la NPT, les équipes soignantes cherchent à en réduire au minimum la durée d'administration en favorisant l'alimentation entérale.

Le deuxième type de complication résulte des atteintes métaboliques induites par le contenu de la NPT. L'hyperglycémie (Savich, Finley, & Ogata, 1988; Vileisis, Cowett, & Oh, 1982) et l'hypoglycémie (notamment lors des changements de débit ou de concentration du glucose en solution) sont des complications de la NPT. Le foie est l'organe principalement atteint. La cholestase hépatique (Merritt, 1986), les lithiases (Kelly, 1998) et la stéatose (Kumpf, 2006) sont des complications bien connues de la NPT néonatale. Dans des cas extrêmes, la cholestase peut progresser vers une fibrose portale irréversible et une cirrhose avec insuffisance hépatique nécessitant une greffe (Kaufman, Gondolesi, & Fishbein, 2003). Quels sont les facteurs de risques liés au développement de complications hépatiques? Les nouveau-nés de très petit poids de naissance, ceux souffrant de certaines pathologies intestinales (atrésie intestinale, gastroschisis, entérocolite nécrosante) (Christensen, Henry, Wiedmeier, Burnett, & Lambert, 2007) et ceux avec retard de croissance intrautérin (RCIU) sont plus à risque (Baserga & Sola, 2004). Quelle est la cause de ces complications? L'étiologie est multifactorielle (Kaufman et al., 2003). Parmi les causes connues, il y a la durée de la période de NPT, la tubulure et le contenu de la solution de NPT.

Cai et al. ont démontré en utilisant un modèle de lapin nouveau-né, que plus la durée de la NPT (de 3 à 10 jours) est longue, plus les altérations biologiques (augmentation de la bilirubine directe) et les changements histologiques au niveau du foie sont marqués. Ils vont d'une inflammation portale (à 3 et 7 jours de NPT) jusqu'à une cholestase et une stéatose hépatique (à 10 jours de NPT). Avec une durée croissante de NPT, on retrouve davantage de cellules apoptotiques et la concentration de malondialdéhyde hépatique, reflet du stress oxydant, croît (Cai et al., 2006).

En passant dans la tubulure de polyvinylchloride (PVC), la NPT emporte des composés de celle-ci qui sont infusés au nouveau-né (Loff, Subotic, Reinicke,

Wischmann, & Brade, 2004). Le di-ethylhexyl-phthalate (DEHP) des tubulures est responsable de changements histologiques au niveau du foie dans un modèle de lapin recevant des quantités similaires de DEHP par alimentation parentérale que les nouveau-nés sous NPT (Loff et al., 2007). Il pourrait donc contribuer à la toxicité hépatique induite par la NPT.

La composition en acides aminés et le contenu calorique sont impliqués dans les causes de complications hépatiques secondaires à la NPT (Kumpf, 2006). L'absence de lipides dans la NPT chez le rat est associée à des paramètres de cytolysse et de cholestase importants et à une infiltration graisseuse du foie suggérant une stéatose (Oshita et al., 2004). Wu et al. ont montré que chez le lapin nouveau-né, l'ajout dans la NPT de glutamine, précurseur du glutathion, réduit les indices de stress oxydant hépatique (concentration hépatique de malondialdéhyde), diminue le taux d'apoptose hépatocellulaire et prévient les changements cholestatiques (Wu, Hong, Cai, Tang, & Shi, 2007). Chez le lapin également, la perfusion de glutathion durant la NPT prévient les changements biologiques et histologiques cholestatiques, diminue l'index d'apoptose et les indices de stress oxydant (mesuré par la concentration de malondialdéhyde) (Hong, Wu, & Cai, 2007). Ces dernières observations suggèrent que le stress oxydant pourrait être impliqué dans la pathogénèse des atteintes hépatiques reliées à la NPT. Ceci est particulièrement relevant puisque la NPT est une source de peroxydes.

## **1.2 L'exposition à la lumière de la nutrition parentérale totale**

L'exposition à la lumière de la nutrition parentérale produit du peroxyde d'hydrogène ainsi que des peroxydes organiques qui représentent pour le nouveau-né, un apport en oxydants pouvant résulter en un stress oxydant.

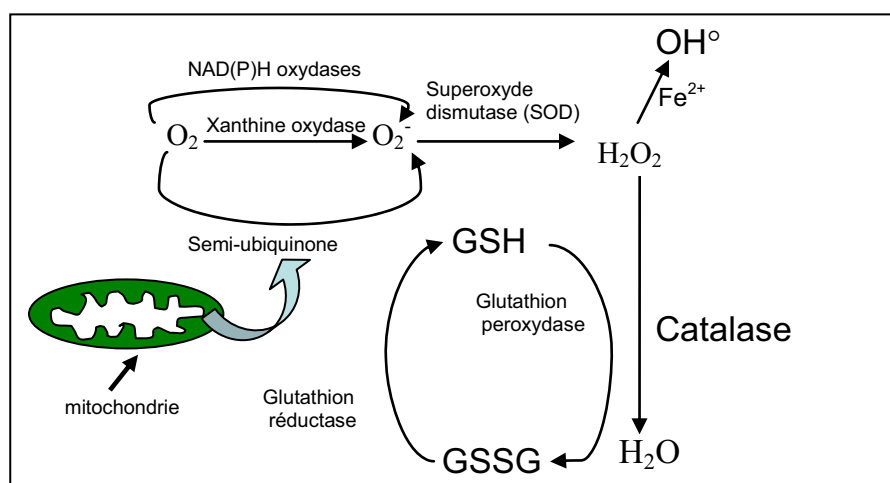
### **1.2.1 Les radicaux réactifs, équilibre redox et stress oxydant**

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont produits dans des conditions normales, notamment par la respiration cellulaire mitochondriale et les défenses antimicrobiennes leucocytaires. La voie de formation et de détoxification des radicaux libres de l'oxygène est présentée dans la figure 1. La réaction de Fenton se produit en présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre et induit la transformation du peroxyde d'hydrogène (principal peroxyde formé lors de l'exposition à la lumière de la NPT) en radical hydroxyle, hautement réactif (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Le glutathion joue un rôle majeur de détoxification. Ainsi, en réponse à une augmentation

des ROS, la voie d'oxydation du glutathion est favorisée et le pourcentage de glutathion oxydé (GSSG) sur glutathion réduit (GSH) augmente. Le GSSG et le GSH forment donc un couple redox dont les concentrations relatives sont un reflet de l'équilibre d'oxydoréduction cellulaire (Schafer & Buettner, 2001). Les dérivés réactifs de l'azote sont formés à partir de la transformation de l'arginine en oxyde nitrique (NO) par l'enzyme oxyde nitrique synthétase (NOS). Le NO peut être converti en de nombreux réactifs comme le peroxy-nitrite ( $\text{NO}_3^-$ ) ou l'anion nitroxyde  $\text{NO}^-$ .

Les radicaux libres sont des messagers de voies métaboliques physiologiques (Droge, 2002). Ils jouent un rôle dans la transduction du signal de nombreux récepteurs membranaires impliqués notamment dans la prolifération cellulaire (Boonstra & Post, 2004), le contrôle de l'homéostasie du glucose (Schmid, Hotz-Wagenblatt, Hacj, & Droge, 1999) ou les défenses immunitaires (Hehner et al., 2000; Davies, 1987). Il existe de nombreuses situations dans lesquelles le status redox est directement impliqué dans la régulation de voies de signalisation cellulaire. La réponse à l'insuline (Schmid, El, Galter, Klein, & Droge, 1998), le devenir de cellules précurseurs (Noble, Smith, Power, & Mayer-Proschel, 2003; Smith, Ladi, Mayer-Proschel, & Noble, 2000) et la fonction des cellules immunitaires répondent directement à de petits changements du status redox.

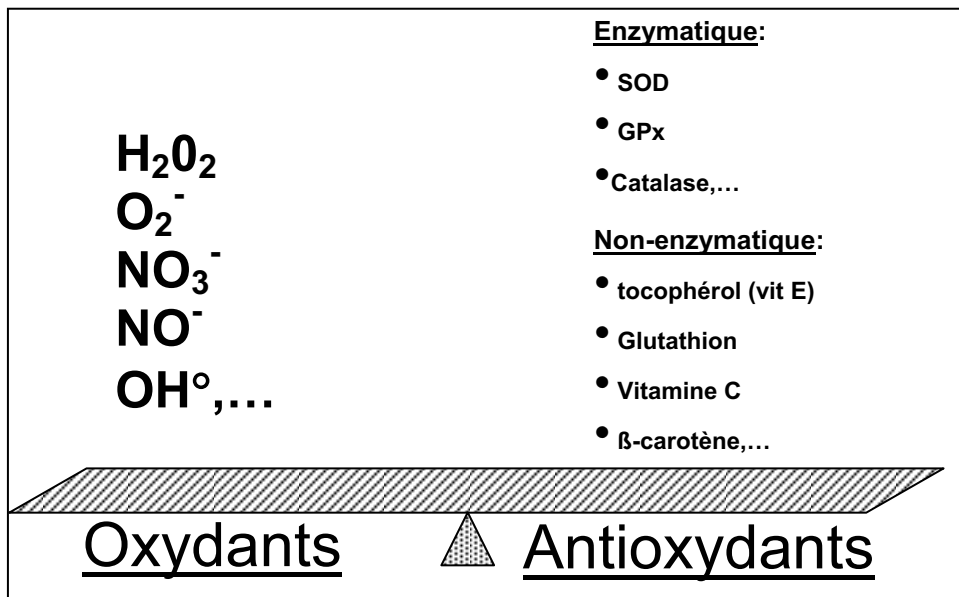
Par contre, à des concentrations plus importantes, les radicaux libres deviennent hautement toxiques et responsables de dommages cellulaires. De nombreuses protéines sont dégradées, voient leur structure et leur fonction modifiées (Davies, 1987), des mutations surviennent dans l'ADN et les lipides des membranes biologiques (Halliwell, 1994) sont peroxydés et voient leur fluidité et perméabilité altérée.



**Figure 1 : La voie de formation et de détoxification des radicaux libres de l'oxygène**

Tout est donc une question d'équilibre entre les molécules oxydantes et les molécules antioxydantes. Lorsque la production de ROS est égale aux capacités de détoxification du système antioxydant, les cellules sont dans un état stable.

Un déséquilibre peut survenir suite à une augmentation des molécules oxydantes ou à la baisse des défenses antioxydantes enzymatiques et vitaminiques (cf. figure 2 ci-dessous). Il se produit alors un stress oxydant.



**Figure 2 : Équilibre redox**

De nombreuses cellules sont alors capables, grâce à des cascades de signalisation sensibles au redox, d'induire la formation d'enzymes antioxydantes ou de promouvoir le système de transport de la cystéine, précurseur du glutathion. Le but de ces systèmes est de tenter de retrouver la situation d'équilibre antérieure. Dans les cas où la production de ROS est augmentée de façon consistante et persistante, l'homéostasie antérieure ne peut être retrouvée et un équilibre déplacé vers des conditions plus oxydantes lui fait place. La conséquence de ce nouvel équilibre est l'induction d'autres voies de signalisation ou l'expression de gènes différents dont l'exploration et les conséquences font l'objet d'une recherche intensive dont nous avons évoqué certains aspects.

Une des difficultés rencontrée dans l'étude du stress oxydant est sa quantification. Les radicaux libres sont réactifs, ont une demi-vie très limitée. Leur dosage ne peut donc pas être effectué pour mesurer directement le stress oxydant. D'autres composés plus stables, formés suite à la réaction des dérivés réactifs de l'azote ou de l'oxygène avec des molécules biologiques, sont utilisés comme mesure indirecte de l'importance du

stress oxydant. Ainsi, les F2-isoprostanes et le 4-hydroxynonanal (HNE) (Meagher & FitzGerald, 2000) sont des reflets de la peroxydation lipidique (Morrow, 2000).

Il est actuellement admis qu'une augmentation chronique des ROS est présente dans un grand nombre de maladies inflammatoires, auto-immunes ou de nombreuses pathologies chroniques. Le stress oxydant joue un rôle dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle (Touyz & Schiffrin, 2004), du diabète (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2003) et de l'athérosclérose (Rosenson, 2004). Il est également impliqué dans les atteintes hépatiques comme la cholestase (Jaeschke et al., 2002) ou la stéatose ainsi que dans la fibrose et la cirrhose (Urtasun, Conde, & Nieto, 2008).

### **1.2.2 Le stress oxydant chez le nouveau-né**

Les évènements liés à la grossesse, à la naissance et aux conditions cliniques du nouveau-né déterminent l'importance du stress oxydant qu'il subit mais aussi la susceptibilité à celui-ci.

La vulnérabilité de l'enfant prématuré au stress oxydant s'explique par deux phénomènes conjoints : l'immaturation de ses défenses antioxydantes (Lavoie & Chessex, 1997) et une augmentation de l'incidence des évènements l'exposant aux dérivés réactifs de l'oxygène. Effectivement, les enfants prématurés sont souvent issus de grossesses compliquées qui les exposent à de nombreuses pathologies liées à une augmentation du stress oxydant. Par exemple, les mères diabétiques de type I ou avec un diabète gestationnel (Peuchant et al., 2004) et celles atteintes de prééclampsie (Roberts & Lain, 2002) présentent, durant la grossesse, une augmentation des indices de stress oxydant (Peuchant et al., 2004; Kamath, Rao, Raghothama, Rai, & Rao, 1998) qui est retrouvée chez le nouveau-né à la naissance (Kamath et al., 1998; Arikian, Konukoglu, Arikian, Akcay, & Davas, 2001). À la naissance, l'augmentation de la pression partielle d'oxygène induit un stress oxydant. De plus, lorsque le nouveau-né est réanimé avec 100% d'oxygène (Vento et al., 2003) ou que son état clinique rend nécessaire une oxygénothérapie, le stress oxydant généré est encore plus important. L'inflammation ainsi que les infections génèrent, elles aussi, des radicaux libres. Toutes ces conditions cliniques sont fréquentes chez les enfants prématurés et les enfants à terme hospitalisés.

Les radicaux libres ont été impliqués dans de nombreuses pathologies néonatales comme la dysplasie bronchopulmonaire (Ogihara et al., 1999), la rétinopathie du prématuré ou l'entérocolite nécrosante (Saugstad, 2001). Les indices de peroxydation qu'ils induisent ont d'ailleurs pu être corrélés avec le pronostic chez les enfants de très petit poids de naissance (Pitkanen, Hallman, & Andersson, 1990).

Les événements prénataux et postnataux déterminent donc l'exposition du nouveau-né au stress oxydant. Dans les unités de soins néonataux, la NPT est une source additionnelle de stress oxydant ayant un impact sur la santé des nouveau-nés.

### **1.2.3 Le contenu en peroxydes de la NPT**

Le recours à la nutrition parentérale est très fréquent en néonatalogie. Les nutriments administrés varient en fonction de la durée d'infusion, de l'âge gestationnel et de la condition clinique du nouveau-né.

Les solutions contenant électrolytes, dextrose et acides aminés ont une charge en peroxydes faible et ne sont pas sensibles à l'effet de la lumière. En néonatalogie, des émulsions lipidiques (intralipides) sont ajoutées dès les premiers jours de NPT dans le but d'augmenter le contenu énergétique et d'administrer des acides gras essentiels nécessaires au développement cérébral et à la croissance (Krohn & Koletzko, 2006). L'ajout de ces intralipides à une solution de glucose et d'acides aminés (Lavoie, Belanger, Spalinger, & Chessex, 1997) a pour effet de tripler le contenu en peroxydes. Des peroxydes lipidiques sont retrouvés dans les solution d'intralipides (Helbock, Motchnik, & Ames, 1993). L'ajout de préparations multivitaminées (MVP) à la NPT mène immédiatement à une augmentation de la concentration en peroxydes in vitro. De plus, une solution de NPT à laquelle on ajoute une préparation multivitaminée devient sensible à la lumière. La riboflavine photosensibilisée catalyse le transfert d'électrons entre un donneur comme la vitamine C, des acides aminés ou des lipides et l'oxygène dissout, produisant du peroxyde d'hydrogène (Laborie, Lavoie, & Chessex, 1998). En trois heures d'exposition à la lumière ambiante, ce qui est de règle en clinique, le contenu en peroxydes augmente de manière très importante (Lavoie et al., 1997). La concentration de peroxydes générée par l'exposition à la lumière augmente avec la quantité relative de préparation multivitaminée présente dans la NPT (Lavoie et al., 1997). Ceci a une implication clinique importante car, lors du sevrage de la NPT, le débit de la préparation multivitaminée n'est habituellement pas réduit en conséquence. Ceci augmente donc la proportion de multivitamines dans la NPT et la quantité de peroxydes produite par l'exposition lumineuse croît en conséquence. Le peroxyde d'hydrogène représente près de 90% des dérivés réactifs induits par la NPT (Helbock et al., 1993), le reste est composé de peroxydes organiques (Laborie et al., 1998). Certains des peroxydes organiques formés ont un rôle biologique. Nous en traiterons ultérieurement.

De plus, l'exposition à la lumière de la NPT réduit la concentration en vitamines antioxydantes et par conséquent les défenses antioxydantes du nouveau-né (Lavoie,

Chessex, Rouleau, Migneault, & Comte, 2004; Haas, Genzel-Boroviczeny, & Koletzko, 2002).

Les deux principales sources de lumière dans les unités de néonatalogie sont la lumière ambiante et la lumière de la photothérapie (qui sert à traiter l'ictère néonatal à bilirubine non conjuguée). La lumière a un effet sur la quantité de peroxyde formée dans le sac et aussi lors du passage de la solution dans la tubulure, reliant le sac de NPT au nouveau-né. Y a-t-il moyen de diminuer la quantité de peroxydes formée? En recouvrant le sac de la NPT avec une protection opaque et en utilisant une tubulure empêchant le passage de la lumière visible, il est possible de réduire de moitié la quantité de peroxyde infusée aux enfants (Lavoie et al., 1997). Mais la protection de la lumière a-t-elle un effet sur la santé des nouveau-nés?

#### **1.2.4 Les conséquences cliniques délétères de l'exposition de la NPT à la lumière à court terme**

Lors de la découverte de l'effet de la lumière sur les solutions de NPT, les pathologies qui étaient imputées à la NPT, ont été réétudiées pour déterminer le rôle de l'exposition à la lumière ambiante dans leur pathogénèse.

Le fait que l'on retrouve des peroxydes dans les urines des enfants prématurés recevant de la NPT exposée à la lumière (Laborie, Lavoie, & Chessex, 2000) suggère que leurs capacités antioxydantes sont dépassées. Chez des cochons d'Inde ayant reçu de la NPT du 3<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour de vie, il existe une corrélation exponentielle entre le status redox hépatique au 7<sup>e</sup> jour et les concentrations de peroxydes infusées (Lavoie et al., 2005) sans évidence de cytolyse.

La cholestase hépatique est une complication redoutée de la NPT. Le stress oxydant et les peroxydes générés par l'exposition à la lumière de la NPT ne semblent pas responsables de l'apparition de cette pathologie (Lavoie et al., 2005; Weinberger et al., 2002; Belli, Albrecht, La Scala, Desjeux, & Pelissier, 2003). Chez le cochon d'Inde, le flux biliaire qui est un déterminant de la cholestase n'est pas influencé par le contenu en peroxyde de la NPT. Ceci suggère que l'exposition à la lumière de la NPT n'est pas responsable de la cholestase (Lavoie et al., 2005).

Chessex et al s'est intéressé à l'effet de la photoprotection de la NPT sur la dysplasie bronchopulmonaire (définie par la dépendance à l'oxygène à plus de 36 semaines d'âge gestationnel corrigé) ainsi que sur la mort. Cette étude a été effectuée sur une cohorte de 77 nouveau-nés prématurés ayant reçu de la NPT au moins jusqu'à J7 (Chessex, Harrison, Khashu, & Lavoie, 2007) . 39 ont reçu de la NPT exposée à la lumière (EL), c'est à dire dont le sac et la tubulure sont dans du matériel transparent et 38 ont



reçu de la NPT protégée de la lumière (PL) c'est à dire que le sac et la tubulure sont recouverts d'un matériel opaque. Dans le groupe NPT EL, 3 enfants sont décédés alors que dans le groupe LP un décès a eu lieu. Cette étude préliminaire suggère que la protection de la lumière permet de diminuer le risque relatif de dysplasie broncho-pulmonaire et de mort de 30%. Cependant le nombre d'enfant étudié ne permet pas d'atteindre le seuil de signification mais la probabilité que cette diminution de risque se confirme est de plus de 80%. Au moins 300 sujets seraient requis pour prouver avec une probabilité de plus de 95% que la photoprotection est nécessaire. Si ces observations sont confirmées par une étude randomisée contrôlée, elles pourraient mener à des recommandations cliniques pour la protection de la lumière de la NPT. Les données animales appuient les études humaines puisque chez le cochon d'Inde, on observe une réduction de l'alvéolisation, des indices de préfibrose ainsi qu'une augmentation du taux d'apoptose suite à l'exposition de la NPT à la lumière durant la première semaine de vie (Lavoie, Rouleau, & Chessex, 2004; Lavoie, Rouleau, Gagnon, & Chessex, 2002). Un des peroxydes organique formé dans la NPT lors de l'exposition à la lumière serait responsable de cet effet (Lavoie et al., 2004).

La pression systolique est légèrement mais significativement supérieure chez les filles prématurées (Chessex et al., 2009) qui reçoivent de la NPT exposée à la lumière. Les conséquences cliniques de cette observation restent à évaluer.

La tolérance à l'alimentation entérale durant la première semaine de vie est améliorée par la protection de la NPT de la lumière. Autant les volumes totaux tolérés que l'augmentation quotidienne (en ml/kg/jour) de l'alimentation entérale sont plus importants dans le groupe de prématurés dont la NPT est protégée de la lumière comparé à un groupe dont la NPT est exposée à la lumière (Khashu et al., 2006). Sachant que la nutrition précoce chez l'enfant prématuré réduit le temps nécessaire pour atteindre une alimentation entérale complète, améliore la croissance et le développement de l'enfant, les conséquences potentielles à long terme de cette observation sont importantes. Cependant, sa durée restreinte à la première semaine de vie et l'absence de suivi à plus long terme nécessite des études subséquentes avant de pouvoir évaluer l'impact de cette observation.

L'exposition à la lumière de la NPT pourrait cependant avoir des effets bénéfiques. Le peroxyde d'hydrogène possède un effet bactériostatique (Hyslop et al., 1995) et est retrouvé en quantité supérieure dans le groupe NPT EL. On sait que des mécanismes de détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont présents chez les bactéries et sont induits par des niveaux faibles de ROS. Leur présence suggère qu'ils sont nécessaires à la survie des espèces bactériennes aérobies (Mongkolsuk & Helmann,

2002) et que les peroxydes leur sont nocifs. On doit donc envisager que l'exposition à la lumière de la NPT, en augmentant les concentrations de peroxydes, possède une activité protectrice en jouant un rôle antibactérien. Ces affirmations sont hypothétiques mais elles mettent en évidence le fait que des études portant sur l'entier des aspects liés à la santé des nouveau-nés sont nécessaires avant de changer la pratique clinique. Les données actuelles ne sont pas suffisantes pour conclure à la supériorité d'un mode d'administration par rapport à un autre.

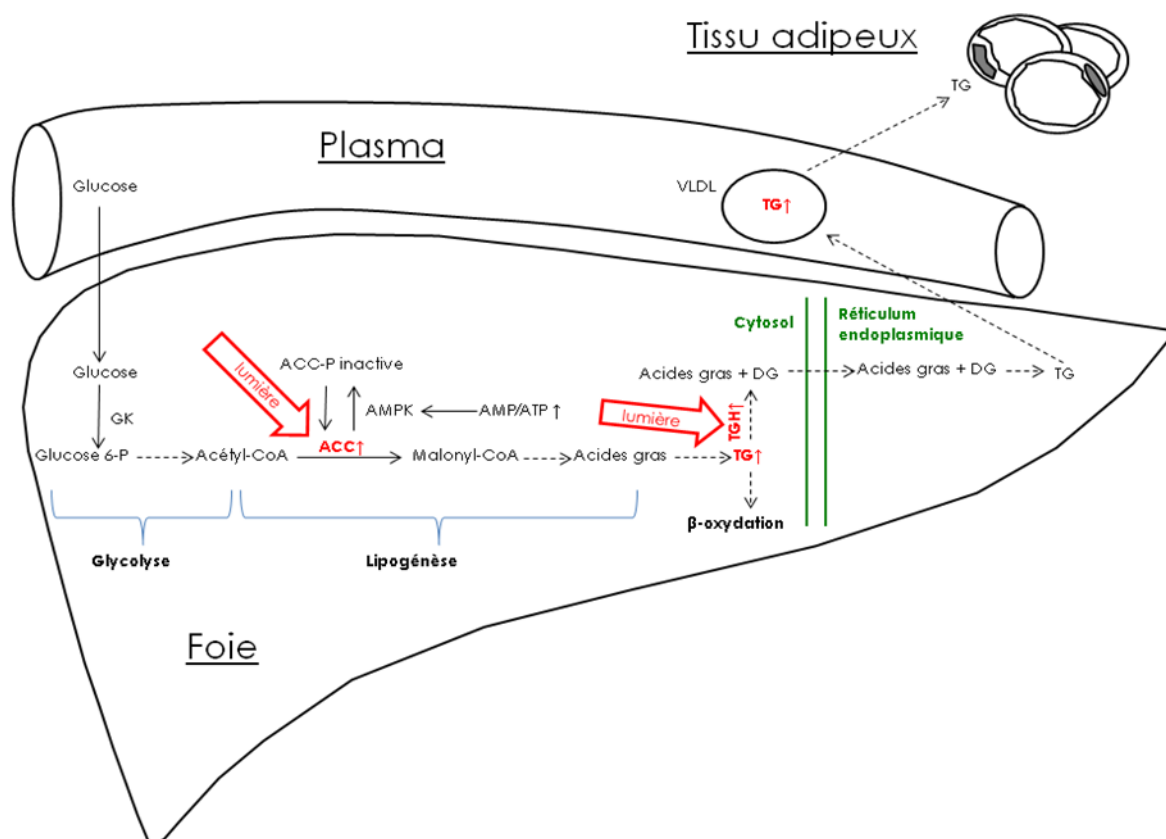
### **1.2.5 Les conséquences à court terme de l'exposition de la NPT à la lumière sur le métabolisme lipidique**

Les lipides constituent la principale réserve énergétique de l'organisme. Ils sont stockés sous forme de triglycérides (TG) dans les cellules adipeuses. La première étape de la synthèse des acides gras qui est aussi l'étape limitante est la carboxylation d'un acétyl CoA en malonyl CoA, par l'acétylCoA carboxylase (ACC) qui a lieu dans le foie. L'ACC est régulée par la protéine kinase AMP dépendante (AMPK). Elle est activée par l'AMP et inhibée par l'ATP. Lorsque le rapport AMP/ATP augmente, l'AMPK est stimulée, elle phosphoryle donc l'ACC qui est inactivée. Au contraire, lorsque l'ATP est abondant, des réserves énergétiques sont formées car l'AMPK est inhibée et l'ACC est par conséquent activée (cf figure 3 ci-dessous). Les VLDL permettent l'apport de TG et de cholestérol du foie aux tissus. La TGH catalyse une étape limitante de leur synthèse, elle hydrolyse les TG et permet leur incorporation dans les VLDL. Pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme, les réserves de TG hépatique et des tissus adipeux sont mobilisées. La lipase des tissus adipeux scinde les TG en glycérol et en acides gras libres (AG). Les AG sont captés par les tissus et servent de source d'énergie.

À court terme, l'exposition à la lumière de la NPT est associée à une stéatose hépatique et à une augmentation du contenu en triglycérides (TG) hépatiques (cf figure 3 ci-dessous). L'exposition à la lumière de la NPT induit, dans un groupe de nouveau-nés prématurés de  $28 \pm 1$  semaines d'âge gestationnel, une augmentation du taux de TG sanguins qui s'amplifie avec l'âge postnatal (Khashu, Harrison, Lalari, Lavoie, & Chessex, 2008). En utilisant le modèle de cochon d'Inde, il a été mis en évidence que les produits de la photooxydation formés lors de l'exposition à la lumière augmentent l'activité de l'acétylCoA carboxylase (ACC) et de la triacylglycérol hydrolase (TGH). L'ACC est stimulée par l'exposition à la lumière (NPT contenant 1% de solution multivitaminée). Nos études tendent à montrer que, durant la période d'infusion de la NPT, les peroxydes ainsi que des substances dérivées des multivitamines sont impliquées dans l'activation de l'ACC, stimulant ainsi la lipogenèse. L'ACC renseigne donc sur le taux de lipogenèse de

novo. Des études au laboratoire ont montré que la TGH est induite par l'exposition à la lumière de la NTP mais ne réagit pas à la présence de peroxydes en absence de multivitamines. Nous pensons donc que la TGH est induite par un composé résultant de l'interaction des peroxydes et de la solution multivitaminée. L'activité de la TGH corrèle avec le taux de TG plasmatiques suggérant une implication directe de cette enzyme dans les changements de triglycérides plasmatiques observés dans le groupe d'enfant prématurés. On sait par ailleurs que l'ascorbylperoxide, composé dérivé de l'interaction de la solution multivitaminée avec la lumière induit également l'activation de l'acétyl CoA carboxylase (Knafo, Chessex, Rouleau, & Lavoie, 2005).

Le rôle précis dévolu aux différents composés de la NPT dans les changements de métabolisme lipidique observés suite à l'exposition à la lumière de la NPT sont en cours d'investigation.



**Figure 3 : Voie métabolique investiguée pour les effets durant l'infusion de NPT**

Les flèches rouges indiquent les réactions enzymatiques stimulées par l'exposition à la lumière et les substrats dont la concentration est augmentée sont indiqués en rouge. Les flèches noires en traits continus indiquent les étapes enzymatiques complètes, celles en traits discontinus les étapes simplifiées.

GK: glucokinase, ACC: acétylCoA carboxylase, AMPK: protéine kinase AMP dépendante, DG: diacylglycérol, TGH: triacylglycérol hydrolase,

Ces changements métaboliques n'ont, pour l'instant, été étudiés qu'à court terme, pendant la période d'infusion de la NPT. À notre connaissance, personne n'a encore recherché la présence d'altération du métabolisme énergétique persistant à distance d'une courte période d'alimentation parentérale en début de la vie. La notion étant maintenant admise que la nutrition et le stress oxydant en période néonatale peuvent avoir un impact sur l'incidence de pathologies adultes, nous avons décidé de rechercher les effets à long terme de la NPT.

### **1.3. La programmation des maladies de l'adulte**

Il est actuellement admis que des évènements se produisant in utero ou en période néonatale entraînent des modifications développementales, métaboliques ou comportementales à l'âge adulte. Ce concept a été décrit il y a plus de cent ans par Spalding. Il avait alors observé que les oiseaux identifiaient comme étant leur mère le premier objet animé qu'ils rencontraient (Spadling, 1873). Il montrait ainsi, pour la première fois, l'influence à long terme d'un stimulus néonatal.

Ce concept s'est depuis, étendu aux influences des changements durant la grossesse et la période postnatale sur l'apparition de maladies chroniques de l'adulte. Suite aux études épidémiologiques rétrospectives de Barker (Barker, Winter, Osmond, Margetts, & Simmonds, 1989; Barker, Eriksson, Forsen, & Osmond, 2002), reliant le poids de naissance à l'apparition future des maladies cardio-vasculaires, est née, à la fin des années 80, l'hypothèse de l'origine foetale des maladies de l'adulte. Lucas a documenté de manière prospective le rôle de la nutrition en période postnatale sur la programmation des pathologies de l'adulte. Il a proposé ce terme qui, depuis, s'est imposé dans la littérature médicale. De nombreuses études ont relié le poids de naissance et d'autres mesures de la croissance prénatale avec l'apparition ultérieure, d'hypertension artérielle (Barker, Bull, Osmond, & Simmonds, 1990; Law et al., 1993; Hales et al., 1991), du diabète de type 2 ou de la résistance à l'insuline (Hales et al., 1991; McCance et al., 1994; Valdez, Athens, Thompson, Bradshaw, & Stern, 1994), de dyslipidémies (Fall et al., 1992; Barker, Martyn, Osmond, Hales, & Fall, 1993), d'obésité (Valdez et al., 1994; Forsen, Eriksson, Tuomilehto, Osmond, & Barker, 1999) et de maladies coronariennes (Eriksson, Forsen, Tuomilehto, Osmond, & Barker, 2001; Stein et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1997; Singhal & Lucas, 2004).

Ces pathologies sont retrouvés ensemble à l'âge adulte plus souvent que le hasard ne le laisserait supposer et sont regroupés sous le terme de syndrome métabolique (SM). Cette observation impose le concept d'une origine pathogénique commune et d'interactions. Les désordres métaboliques du SM sont étroitement liés au métabolisme énergétique ainsi qu'au métabolisme lipidique.

Les études rétrospectives effectuées sur les individus dont les mères ont été exposées à la famine durant différentes périodes de la grossesse sont d'un grand intérêt. Ces études ont notamment mis en lumière le fait que la programmation pouvait avoir lieu sans que le poids de naissance ne soit affecté. L'effet futur de la sous-nutrition est lié à la durée de celle-ci et à la période de la grossesse durant laquelle elle a lieu (Roseboom et al., 2001). Il existe donc une fenêtre de temps durant laquelle la susceptibilité à l'atteinte est présente.

De nombreuses études animales sont venues renforcer la théorie de la programmation fœtale des maladies adultes et ont permis l'étude de certains mécanismes impliqués. Elles ont démontré que les manipulations des stades préconceptionnels (Kwong, Wild, Roberts, Willis, & Fleming, 2000), embryonnaires, fœtaux et néonataux pouvaient mener à des altérations des fonctions métaboliques et cardiovasculaires. La plupart de ces manipulations ont touché la diète, soit par une sous-nutrition (Vickers, Breier, Cutfield, Hofman, & Gluckman, 2000), une diète pauvre en protéines (Pladys et al., 2004) ou riche en lipides (Khan et al., 2003). L'étude des conséquences à long terme d'une NPT en période néonatale n'a pas été rapportée dans la littérature à ce jour.

### **1.3.1 Les mécanismes de la programmation développementale**

Différentes hypothèses sont nées pour expliquer l'association entre les facteurs de la vie fœtale et néonatale et l'apparition de pathologies chez l'enfant plus vieux et l'adulte.

L'hypothèse de la plasticité du phénotype explique cette association par les influences environnementales sur la structure et la fonction à long terme. Par exemple, la proportion de pancréas occupée par les îlots pancréatiques fœtaux est corrélée positivement avec le poids de naissance. Chez les enfants présentant un RCIU important, cette proportion peut être réduite de moitié, la fonction des cellules  $\beta$  les composant est altérée et les niveaux d'insuline sont inférieurs. Ainsi des conditions in utero adverses menant à un RCIU portent atteinte au développement et à la fonction du pancréas endocrine (Fowden & Hill, 2001). Différentes études se sont intéressées à la programmation hépatique par la diète. Chez des portées de rat allaités durant 21 jours

dont le nombre de bébé est réduit ou augmenté, la sous-nutrition ou la surnutrition qui s'en suit mène à des changements pondéraux et des enzymes hépatiques qui persistent à 20 semaines de vie. Chez les portées de rats surnutris, la proportion de tissu adipeux est augmentée et les enzymes hépatiques de la lipogenèse montrent une activité plus importante à 20 semaines de vie. Ces observations suggèrent une augmentation de la capacité de synthèse lipidique par le foie induite par des changements d'apports alimentaire en période néonatale (Duff & Snell, 1982). Chez des rats issus de portées dont la mère a reçu une diète faible en protéines, les enzymes hépatiques montrent des changements enzymatiques à long terme en faveur de la gluconéogenèse (Desai et al., 1997). Les changements enzymatiques induits par des variations de la diète suggèrent que les enzymes puissent être induites de façon différente en raison de leur localisation cellulaire au sein du lobule hépatique (différentiation des cellules de la zone périportale par rapport à celles localisées dans la zone périverneuse) (Desai & Hales, 1997; Desai et al., 1997). Dans le foie de rats issus d'une mère ayant reçu une diète faible en protéines in utero, la quantité de glucose formée suite à une infusion de lactate est augmentée. Cette différence est secondaire au fait que le glucose formé dans la région périportale n'est pas capté en région périverneuse comme c'est le cas dans le groupe contrôle (rat nourri avec une diète avec une quantité standard de protéines (20%)). Des changements histologiques sous forme d'une augmentation de la taille des lobules hépatiques sont également retrouvés dans le groupe avec diète maternelle restreinte en protéines (Burns et al., 1997). Donc ces données suggèrent que des changements de différenciation des hépatocytes pourraient être responsables d'une altération des métabolismes glucidiques et lipidiques (Desai, Crowther, Ozanne, Lucas, & Hales, 1995).

Les interactions entre les gènes et l'environnement durant la période du développement conditionnent l'équilibre métabolique futur (Eriksson et al., 2002). Par exemple, les individus avec polymorphisme Pro12Pro du gène PPAR- $\gamma$ , un récepteur nucléaire qui module l'expression de nombreux gènes dont des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique présentent une résistance à l'insuline qui ne se manifeste que si leur poids de naissance est bas.

Des changements épigénétiques sont induits par des stimuli néonataux et mènent à des changements endocriniens persistants. Un bel exemple de ces mécanismes est donné par le comportement des mères rates durant la période néonatale (Weaver et al., 2004). Les rats dont la mère a davantage présenté des comportements de toilettage et de léchage ainsi qu'une proximité avec des contacts physiques rapprochés ont une réponse au stress du système cortico-surrénalien à l'âge adulte diminuée. Cette réponse diminuée s'explique par une expression du récepteur

aux glucocorticoïdes (GR) au niveau hypothalamique augmentée. Lorsque le comportement maternel est davantage axé sur les soins et la proximité il y a une diminution de la méthylation de l'exon codant pour la séquence promotrice du gène du récepteur GR durant la première semaine de vie et une augmentation de l'acétylation des histones qui résulte en une augmentation du nombre de récepteur GR au niveau hypothalamique. Le nombre de récepteur chez les animaux ayant reçu peu de soins de proximité de leur mère peut être restauré suite à un traitement intracérébro-ventriculaire par TSA qui permet à la fois d'acétyler les histones et de demétyler la séquence promotrice du gène GR. Ceci résulte en une réponse au stress du système cortico-surrénalien qui devient comparable aux animaux ayant eu des soins de proximité avec leur mère. Ce concept de réversibilité des mécanismes programmés pourrait avoir des retentissements cliniques importants s'ils pouvaient être applicables à la programmation des maladies de l'adulte.

Le « phénotype économique », est une théorie permettant d'expliquer la raison pour laquelle l'environnement prénatal mène à une modification permanente du métabolisme (Simmons, 2005). Une adaptation se fait à l'environnement prénatal sous forme de changements enzymatiques et de différenciation tissulaire permettant à l'organisme d'atteindre un équilibre dans les conditions qui lui sont imposées. Dans les conditions où ce milieu intrautérin est semblable à ce qui est rencontré dans la vie extrautérine, cette adaptation précoce est avantageuse. Cependant, lorsqu'il y a une différence entre les conditions intra et extrautérines pour ce qui est de la richesse calorique ou du contenu de l'alimentation, cette adaptation devient néfaste. Le risque de développer le diabète de type 2 et le syndrome métabolique est alors renforcé par la disparité entre les apports nutritionnels pré et postnataux. Dans la société actuelle, les habitudes alimentaires tendent vers l'excès, l'activité physique suit le courant inverse menant à une disparité toujours plus marquée entre les mécanismes programmés et la réalité rencontrée.

### **1.3.2 La croissance accélérée et la nutrition postnatale**

La croissance accélérée se définit par une vélocité de croissance supérieure à la moyenne pour l'âge et le sexe. On retrouve dans la littérature des données suggérant qu'une croissance augmentée durant les premières années de vie chez des individus de petit poids de naissance peut augmenter le risque de maladies cardio-vasculaires à long terme (Singhal, Cole, & Lucas, 2001; Singhal, Cole, Fewtrell, & Lucas, 2004; Singhal et al., 2002; Singhal, Fewtrell, Cole, & Lucas, 2003). L'évolution de la croissance dans l'enfance détermine le risque cardio-vasculaire chez l'adulte (Forsen et al., 1999; Forsen, Osmond,

Eriksson, & Barker, 2004). Une étude rétrospective chez la population finlandaise a déterminé, sur une cohorte de 4630 hommes, le risque de développer une maladie coronarienne en fonction du poids de naissance et de la croissance dans l'enfance (Eriksson et al., 2001). Elle montre qu'une croissance pondérale et du BMI plus importante, indépendamment du poids de naissance, était associée à un risque augmenté de maladie coronarienne. Les hommes ayant développé une maladie coronarienne étaient de petit poids à la naissance et avant un an puis présentaient une accélération de la croissance pondérale et du BMI dans l'enfance. Deux études similaires ont été menées chez des femmes dans cette même population (Forsen et al., 1999; Forsen et al., 2004). Un poids de naissance plus petit et une croissance accélérée dans l'enfance (après 4 ans) ont été identifiés comme étant des facteurs de risque du développement de maladies coronariennes. Une étude récente (Salonen et al., 2009) s'est intéressée à relier la croissance dans l'enfance avec le risque de syndrome métabolique dans une cohorte de 588 adultes de poids normal ( $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ). Elle démontre que, chez les hommes, une augmentation du BMI dans la petite enfance (de la naissance à l'âge de 2 ans) était associée à un risque réduit de syndrome métabolique. Chez une population d'adultes obèses, un gain de poids et de BMI augmenté dans la petite enfance (jusqu'à deux ans) et dans l'enfance (de 2 à 7 ans) est associé à une diminution du risque de syndrome métabolique à l'âge adulte (Salonen et al., 2009).

L'environnement postnatal joue également un rôle dans la programmation des maladies de l'adulte. La tension artérielle (Singhal et al., 2001), la résistance à l'insuline (Singhal, Fewtrell, Cole, & Lucas, 2003), le profil lipidique (Singhal et al., 2004) et l'obésité (Singhal et al., 2002) sont influencés par l'alimentation postnatale. L'alimentation par le lait maternel aurait un rôle protecteur pour les principaux facteurs de risque cardiovasculaires ainsi que pour le syndrome métabolique.

### **1.3.3 Programmation par le stress oxydant**

Un rôle important pourrait être attribuable aux effets du stress oxydant durant la période clef du développement (Luo et al., 2006). Tel que mentionné précédemment, le stress oxydant est augmenté chez les enfants nés de mère présentant des pathologies de la grossesse prédisposant à la prématurité.

Le stress oxydant est également impliqué dans la pathogénèse des facteurs de risques cardiovasculaires de l'adulte (Block et al., 2002). On connaît l'implication des ROS dans les métabolismes lipidiques et glucidiques (Heffetz, Rutter, & Zick, 1992), dans les



pathologies hépatiques (Urtasun et al., 2008; Jaeschke et al., 2002) ainsi que dans les mécanismes vasculaires régulant la tension artérielle (Touyz & Schiffrin, 2004).

L'implication du stress oxydant dans le continuum du développement et dans les pathologies de l'adulte a fait naître l'idée qu'il pourrait être responsable de l'apparition des pathologies programmées de l'adulte. Il demeure difficile de déterminer si la présence du stress oxydant est primaire ou secondaire. L'infusion de peroxydes par la NPT est d'un grand intérêt car elle permet de tester l'effet du stress oxydant et son implication primaire dans la genèse de modifications métaboliques à long terme.

## **2. Objectifs et Hypothèse**

Nous avons vu que les conditions périnatales peuvent avoir des conséquences sur la santé future des nouveau-nés. Les prématurés reçoivent de la nutrition parentérale dont l'exposition à la lumière induit la formation de peroxydes. Nous émettons l'hypothèse que des changements métaboliques chez l'adulte peuvent être induits par une alimentation parentérale donnée en période néonatale et que ces changements seront majorés si la NPT est exposée à la lumière.

Afin de valider cette hypothèse, nos objectifs sont:

1. Rechercher la présence d'un changement du métabolisme lipidique et glucidique sanguin et hépatique chez l'adulte suite à l'administration de NPT exposée ou non à la lumière en période néonatale.
2. Comparer les changements des métabolismes des glucides et lipides entre les groupes sous alimentation parentérale totale avec un groupe nourri exclusivement par voie entérale.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1 Le cochon d'Inde comme modèle**

Le cochon d'Inde et l'être humain sont dépendants de la vitamine C car ils sont incapables de la synthétiser (Sauberlich, 1994; Turley, West, & Horton, 1976). Cette caractéristique commune est essentielle lorsqu'il s'agit d'étudier des mécanismes touchant au potentiel oxydant car la vitamine C est une molécule jouant un rôle clef dans l'équilibre oxydant. L'absence de ce système antioxydant dans les deux espèces permet donc de réduire la possibilité d'un biais. Une autre caractéristique commune aux deux espèces est qu'en période néonatale, leur système du glutathion, autre antioxydant ubiquitaire, est immature (Rickett & Kelly, 1990).

Un autre atout du cochon d'Inde est son métabolisme des acides gras qui présente de nombreuses similarités avec celui des êtres humains (Fernandez, 2001). Cette particularité en fait un modèle approprié pour l'étude de leur métabolisme.

À cela s'ajoute le fait que la possibilité d'induire des changements métaboliques à long terme a été démontrée chez cette espèce (Kind, Simonetta, Clifton, Robinson, & Owens, 2002; Kind et al., 2003; Kind et al., 1999) ce qui est particulièrement important dans le cadre de notre étude.

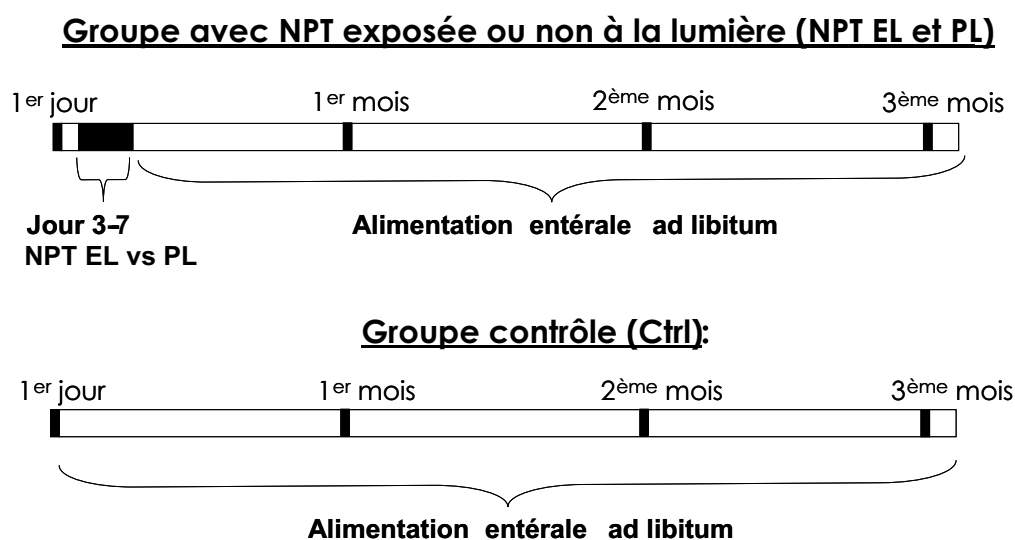
#### **3.2 Les animaux**

Des cochons d'Inde ont été utilisés en accord avec un protocole approuvé par le comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) de l'hôpital Sainte-Justine édifié sur la base des principes du conseil canadien de protection des animaux.

Des cochons d'Inde Hartley (laboratoire Charles River, St-Constant, Québec, Canada) reçoivent de la nutrition parentérale totale (Dextrose 5% + NaCl 0,45% + acides aminés 4,8g/kg/jour + lipides 3,8 g/kg/jour et 1% de préparation multivitaminée) du 3<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour de vie à un débit constant de 220 ml/kg/jour. Sous anesthésie intrapéritonéale de kétamine et xylazine ainsi que de lidocaïne topique, un cathéter est placé dans la veine jugulaire externe (Luther Medical Products, Tustin, CA) et est extériorisé dans la région scapulaire. Le contenu de la NPT est comparable à celui reçu par les nouveau-nés dans les unités de soins néonataux. Les cycles de lumière et d'obscurité sont de 12 heures.

Les animaux sont divisés en trois groupes: deux groupes reçoivent de la NPT et le groupe contrôle est nourri par voie entérale. Le premier groupe de NPT reçoit une NPT

exposée à la lumière (groupe NPT EL)(n=6) et le second reçoit une NPT dont le sac et la tubulure sont protégés de la lumière (groupe NPT PL)(n=6). Les solutions nutritives sont protégées de la lumière dès leur fabrication ce qui permet d'en réduire la charge en peroxydes de près de 3 fois (NPT EL: 169 +/- 51 $\mu$ mol/L vs NPT PL: 48 +/- 28 $\mu$ mol/L). Le groupe contrôle (n=4) est composé d'animaux qui subissent la même chirurgie que les animaux des groupes NPT mais qui sont nourris par voie entérale exclusivement. Ils ne reçoivent pas de perfusion.



**Figure 4 : Protocole nutritionnel pour les groupes NPT et le groupe témoin**

Au 7<sup>e</sup> jour de vie, la nutrition parentérale des groupes NPT est arrêtée et les animaux sont alors nourris ad libitum par voie entérale (High Fiber Guinea Pig Diet 2041, Harlan Teklad Global, Wilmington, DE) avec la même diète que le groupe contrôle. La figure 4 décrit la séquence des événements. Lors du début du protocole, 3 animaux des groupes NPT sont morts (2 dans le groupe NPT PL et 1 dans le groupe NPT EL) lors de l'arrêt de la NPT. Par la suite, nous avons donc effectué une baisse par palier de la NPT (0.5 ml/h durant 3 heures), accompagnée de l'initiation concomitante de la nutrition entérale durant une période de trois heures ce qui a permis d'éviter d'autres décès.

Entre la 13<sup>e</sup> et la 14<sup>e</sup> semaine de vie, suite à un jeûne de 12 heures, les animaux sont sacrifiés. Cette période de sacrifice est choisie en fonction de la croissance des cochons d'Inde. Elle est maximale durant le deuxième mois de vie. Par la suite, à trois mois de vie, cette vitesse de croissance diminue. La maturité sexuelle est acquise vers deux à trois mois de vie. Si on extrapole à l'être humain, bien que la comparaison ne

puisse se faire directement, on peut supposer que cette période correspond à celle de la fin de l'adolescence durant laquelle la courbe de vélocité de croissance s'infléchit.

Les cochons d'Inde sont anesthésiés avec un mélange d'isoflurane et d'air ambiant et les carotides sont prélevées. Par la suite, ils sont sacrifiés par exsanguination intracardiaque. L'isoflurane est choisi en raison de la longueur de la procédure et de la possibilité de le titrer pour obtenir la profondeur d'anesthésie désirée durant le temps désiré. L'isoflurane s'utilise habituellement avec de l'oxygène et non avec de l'air ambiant comme nous l'avons fait. La raison de ce choix résulte du souci de ne pas engendrer d'hyperoxygénation qui pourrait modifier l'équilibre redox que nous désirons étudier.

### **3.3 Évolution du poids**

Les cochons d'Inde sont pesés chaque mois.

### **3.4 Dosage des triglycérides et du cholestérol sanguin**

Chaque mois à partir de la fin de la NPT, suite à un jeûne de 7h, une prise de sang est effectuée dans la veine saphène externe pour la mesure du taux de triglycérides (TG) et de cholestérol.

Les TG sont dosés par méthode colorimétrique enzymatique. Suite à l'hydrolyse des TG en glycérol et en acides gras par une lipoprotéine lipase, le glycérol formé est transformé en glycérol-3-phosphate puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydases, l'eau oxygénée réagit avec l'amino-4-phénazone et le phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge dont l'absorbance est mesurée à 500nm. L'étalon utilisé est le standard de glycérol (Roche #166588) auxquelles les concentrations plasmatiques sont extrapolées.

Le dosage du cholestérol fait également appel à une méthode colorimétrique enzymatique. Sous l'action de la cholestérol estérase, les esters de cholestérol sont scindés en cholestérol libre et en acides gras. Puis le cholestérol est transformé en  $\Delta^4$ -cholesténone et en eau oxygénée sous l'action de la cholestérol oxydase. La dernière étape est similaire à celle du dosage des TG avec la formation d'un dérivé coloré rouge formé par réaction avec l'eau oxygénée et dont l'intensité de coloration est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol et est mesurée par photométrie à 500 nm en corrélant les valeurs à celles du sérum d'étalonnage (Roche C.f.a.s. #10759350).

### **3.5 Dosage des triglycérides et du cholestérol hépatiques**

La méthode de dosage des triglycérides et du cholestérol hépatiques fait appel à la même technique que celle décrite ci-dessus. Une étape supplémentaire est requise pour extraire les lipides hépatiques. Nous commençons par effectuer un homogénat avec du salin en dilution 1:3 dont nous prélevons 100 µl que nous ajoutons à 2 ml de solution de Folch, consistant en un mélange de chloroforme et de méthanol (CHCl<sub>3</sub>: MeOH; 2 :1). Après une heure d'agitation continue, nous ajoutons 20% du volume total en salin puis passons le mélange sur l'agitateur et le centrifugeons par la suite à 2900 RPM durant 10 min. Nous aspirons ensuite la couche supérieure en suspension en prenant garde de ne pas aspirer la couche solide intermédiaire. Nous prélevons ensuite la phase inférieure et l'évaporons à sec, sous azote. Nous suspendons une seconde fois le résidu dans la solution de Folch et y ajoutons 125µl de thesit (Polyethylene glycol dodecyl ether) 20% (Thesit, Fluka Chemika, Steinheim, Switzerland) dans du chloroforme. Nous évaporons le tout à sec une seconde fois et suspendons le restant dans 1,25 ml d'eau. Le dosage subséquent est effectué de la même façon que décrit pour le dosage plasmatique des TG et du cholestérol. Les valeurs de triglycérides et de cholestérol sont rapportées en proportion de la quantité de protéines. Celles-ci sont dosées grâce à un kit de Bio-rad (Bio-Rad Protein Assay de la compagnie Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California US) se basant sur la méthode de Bradford en utilisant le BSA comme étalon.

### **3.6 Métabolisme des glucides**

Chaque mois, la glycémie à jeun est mesurée par un test rapide par bandelettes (One Touch®Ultra, LifeScan). La mesure du glucose fait appel à un processus électrochimique. La glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en acide gluconique. Les électrons générés par la réaction produisent un courant électrique qui est quantifié par des électrodes. Ce courant est proportionnel à la concentration de glucose dans l'échantillon et est convertit en une valeur, en mM, qui est affichée sur le moniteur.

### **3.7 Mesure du mouvement**

Nous avons décidé de mesurer le mouvement dans le but de déterminer si des groupes sont plus sédentaires que d'autres ou, en d'autres termes, si un mode

d'alimentation néonatale a un effet à long terme sur les propensions de l'animal à dépenser de l'énergie pour des activités physiques. Les animaux sont mis dans des cages transparentes séparées insérées dans un système de détection du mouvement composé de 16 rayons infrarouges placés sur un même axe (Digiscan DMicro Monitor Accuscan Instruments, Inc., Columbus, Ohio). L'information résultant de la coupure d'un rayon est transmise à un module (Versamax Analyser, Accuscan Instruments, Columbus, Ohio USA) relié à un ordinateur. Après une période d'accoutumance de deux heures, durant lesquelles l'animal est mis à l'abri de stimulations visuelles et sans nourriture, le mouvement est enregistré sur une période de 4 heures. Les mesures sont séparées en périodes distinctes de 10 minutes permettant par la suite une analyse temporelle des résultats.

### **3.8 Mesure de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique**

#### **3.8.1 L'activité de la TGH (Triacyl Glycérol Hydroxylase)**

L'activité hépatique de la TGH est mesurée selon la méthode of Dolinsky et al (Dolinsky, Douglas, Lehner, & Vance, 2004) par l'hydrolyse du 4-methylumbelliferyl heptanoate (Sigma, Oakvill, On, Canada) en 4-methylumbelliferyl, composé fluorescent.

Environ 200 mg de foie sont homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation froid (10mM TRIS-HCl pH 7.4, 0.25 M sucrose, 2mM EDTA-Na<sub>2</sub>) et centrifugés à 1 400 x g durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et centrifugé à 12 000 x g durant 10 minutes puis conservé (S<sub>1</sub>). Le culot est à nouveau suspendu dans le tampon d'homogénéat puis centrifugé à nouveau à 12 000 x g durant 10 minutes (S<sub>2</sub>). S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sont combinés et centrifugés à 100 000 x g durant 1 heure. Le culot résultant est suspendu dans 0,5 mL de tampon d'homogénéisation et conservé à -80°C jusqu'au dosage. L'échantillon (10 ug protéine) est suspendu dans 1 mL de tampon de réaction (20mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 300mM taurodeoxycholate). La réaction est initiée par l'ajout du substrat 4-methylumbelliferyl heptanoate (1.25 uL d'une solution mère de 2 mM dans tetrahydrofuran) et la cinétique est mesurée par fluorométrie (longueurs d'ondes d'excitation de 355nm et d'émission de 460 nm). La lecture des échantillons s'effectue toutes les minutes durant 10 minutes. Une courbe étalon de 4-methylumbelliféron sodium (0.025 à 2.5 uM) est lue directement. L'activité est exprimée en nmol/min/mg de protéine.

### 3.8.2 L'activité de l'AMPK et de l'ACC (l'acétyl-CoA carboxylase)

Les échantillons sont préparés de façon similaire pour l'AMPK et l'ACC (Makinde, Gamble, & Lopaschuk, 1997; Kudo, Barr, Barr, Desai, & Lopaschuk, 1995). Environ 200 mg de foie sont homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation froid (50mM Tris-HCl pH 7.5, 250mM mannitol, 50mM NaF, 5mM Sodium pyrophosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 4µg/ml inhibiteur de protéases, 1mM benzamidine) et centrifugés à 14 000 x g durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est prélevé et dilué avec du PEG (polyéthylène glycol 8000) 25% (g/v) de manière à obtenir une concentration finale de PEG de 2.5%, incubé 10 min sur glace avec agitation et centrifugé à 10 000 x g durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est à nouveau prélevé, son volume est noté de manière à pouvoir en porter la concentration en PEG 8000 à 6% (en utilisant la solution concentrée PEG 8000 à 25% et en tenant compte de la concentration de PEG de 2,5% déjà présente dans l'échantillon). Puis, il est incubé 10 min sur glace avec agitation et centrifugé à 10 000 x g durant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec le tampon d'homogénéisation (1ml) contenant 6% de PEG puis centrifugé à 10 000 x g durant 10 minutes à 4°C. Par la suite, le culot est suspendu dans 500µl de tampon de suspension (100mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaF, 5mM sodium pyrophosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 4µg/ml inhibiteur de protéases, 1mM benzamidine, 0.02% sodium azide (g/v), 10%glycérol (v/v)) et conservé à -80°C jusqu'au dosage.

La détermination de l'activité de l'AMPK (Makinde et al., 1997; Kudo et al., 1995) est basée sur l'incorporation de P<sup>32</sup> (AT<sup>32</sup>P, 3 Ci/mmole, Amersham) dans un peptide synthétique SAMS (HMRSAMSGLHLVKRR) (Synthèse de peptide de l'est du Québec, Québec, Canada) correspondant à la séquence de l'ACC phosphorylée par l'AMPK. L'activité est exprimée en pmol de P<sup>32</sup> incorporé dans SAMS/min/mg de protéine. L'échantillon (4µg protéine) est préincubé 5 min à 30°C dans 20µL de tampon de réaction (40mM HEPES-NaOH pH 7.0, 80 mM NaCl, 8%Glycérol (v/v), 0.8mM EDTA, 0.8mM Dithiothreitol, 200µM SAMS, avec ou sans 200µM 5'-AMP comme activateur). La réaction est initiée par l'ajout de 200µM d' [<sup>32</sup>P]ATP (500 dpm/pmol) /5mM MgCl<sub>2</sub> puis, l'incubation s'opère pendant 5 minutes à 30°C (volume final de réaction 25 µL). L'arrêt de la réaction s'effectue par l'application de 15µl du milieu réactionnel sur un papier de phosphocellulose de 1 cm<sup>2</sup> (P81 Whatman). Une fois séché, le papier est lavé à 4 reprises dans 10ml d'une solution de 150mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pour 20 minutes et une fois dans l'acétone. La radioactivité est mesurée après une période de séchage de 18 heures dans 6ml de liquide à scintillation.

L'activité de l'ACC est mesurée par la fixation, sur l'acétyl-CoA, de C<sup>14</sup>-bicarbonate (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, 14 mCi/mmole, Sigma-Aldrich) et est exprimée en nmol de



malonyl-CoA produit/min/mg de protéine (Makinde et al., 1997; Kudo et al., 1995). L'échantillon (25µg de protéines) est préincubé 20 min à 37°C dans 162.5 uL de tampon de réaction (60.6mM Tris acétate pH 7.5, 1mg/ml BSA, 1.3 µM 2-mercaptoethanol et 5mM acétate de magnésium, 2.1 mM ATP et 1.1 mM acétyl-CoA, avec ou sans 100 mM glutamate comme activateur). La réaction débute avec l'ajout du substrat 18.2 mM NaHCO<sub>3</sub>-<sup>14</sup>C (1000 dpm/nmol) puis, l'incubation s'opère pendant 5 minutes à 37°C (volume final de réaction 167.5 uL). La réaction est arrêtée par l'ajout de 25µl d'une solution de 10% d'acide perchlorique (v/v), suivi d'une incubation à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est obtenu par centrifugation à 1000 x g durant 20 minutes à température pièce et séché sous la hotte durant une nuit. 4 mL de liquide à scintillation sont ajoutés et la radioactivité est mesurée.

### 3.8.3 Dosage de l'activité de la Glucokinase

Hexokinase (bas Km; haute affinité) et glucokinase (haut Km; basse affinité) sont présentes dans le foie. Cependant la glucokinase est majoritaire dans cet organe. Ces deux enzymes catalysent la production de glucose-6-phosphate à partir du glucose. La mesure de leurs activités est possible via la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui réduit le NADP lors de la transformation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate. La discrimination entre les deux enzymes est possible par soustraction de l'activité totale (GK + HK) à 100 mM glucose et l'activité de l'hexokinase à 0.5mM de glucose.

Environ 200mg de foie sont homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation froid (100mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM KCl, 0,7µl/ml 2-mercaptoéthanol) et centrifugés à 1 400 x g durant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est centrifugé à 12 000 x g durant 10 minutes à 4°C, puis conservé (S<sub>1</sub>). Le culot est suspendu dans 0.5 mL de tampon d'homogénat et centrifugé à 12 000 x g durant 10 minutes à 4°C (S<sub>2</sub>). S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sont combinés et conservés à -80°C jusqu'au dosage. L'échantillon (200 ug protéine) est incubé 1 heure à 30°C dans 3 mL (volume final) d'un tampon réactionnel (100mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP, 0.2mM NADP, 0.2U G-6-P déshydrogénase) auquel sont ajoutées deux concentrations différentes de glucose 0.5 et 100 mM. La réaction est initiée par l'ajout de l'échantillon. Un blanc de réaction est effectué en remplaçant les protéines par de l'eau. La production de NADPH (coefficient d'extinction molaire de 6.22) est lue au spectrophotomètre à 340 nm. L'activité enzymatique de la GK exprimée en mole/min/mg protéine est quantifiée en soustrayant l'activité à 0.5mM de glucose à celle à 100m.

### **3.8.4 Dosage de l'activité de la Phosphofructokinase-1**

La mesure de l'activité de la PFK-1 est possible via l'oxydation de 2 équivalents NADH lors de la production d'un équivalent de fructose-1,6-P<sub>2</sub> à 25°C.

Environ 200mg de foie sont homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation froid (50mM Triethanolamine pH 7.3, 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 15mM KFI, 3mM EGTA) et centrifugés à 12 000 x g durant 2 minutes à 4°C. Le surnageant est centrifugé à 100 000 x g durant 10 minutes à 4°C, puis conservé à -80°C jusqu'au dosage. L'échantillon (300 ug protéine/10uL) est incubé dans 1 mL d'un tampon réactionnel (50mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM Fructose-6-phosphate, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16mM NADH, 2.5mM DTT, 1mM EDTA, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 unité Aldolase, 2.4 unités Triose phosphate isomerase, 0.4 unité  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase) et une lecture de base est obtenue à 340nm pendant 2 minutes. La réaction est initiée par l'ajout de 1mM ATP (10uL) et la cinétique obtenue sur 8 minutes. L'activité enzymatique de la PFK-1 exprimée en mole/min/mg protéine est quantifiée par la production de NAD<sup>+</sup> (coefficient d'extinction molaire de 6.22).

### **3.9 Analyses statistiques**

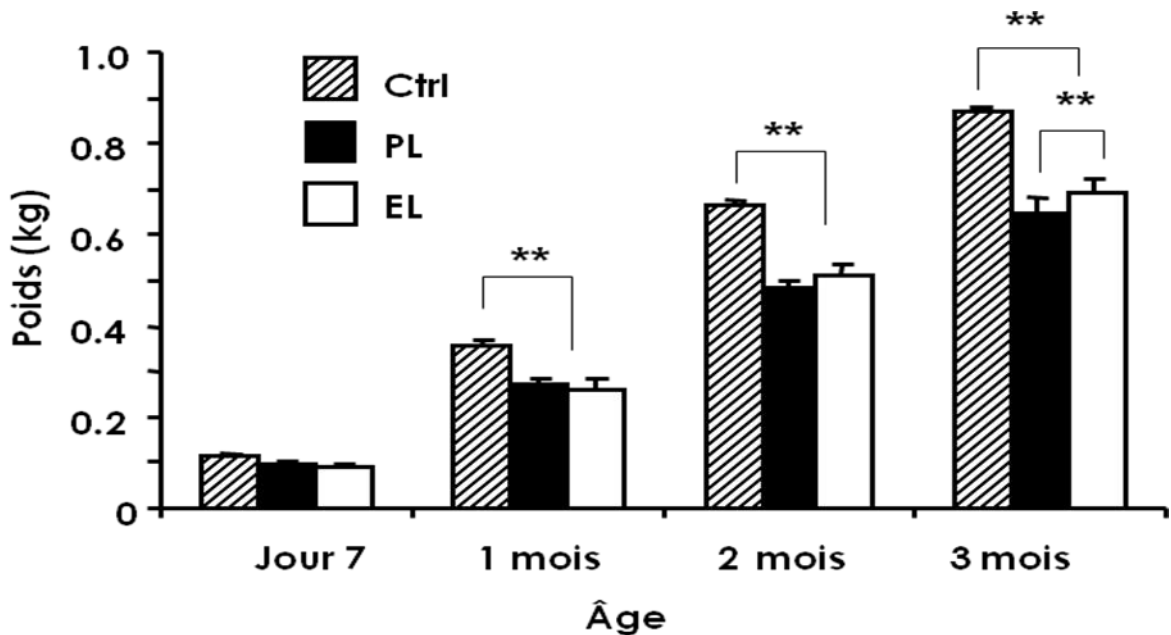
Les valeurs sont exprimées en moyenne +/- s.e.m. Toutes les comparaisons sont orthogonales et sont analysées par ANOVA (témoin vs [sans vs avec protection contre la lumière ambiante]). Le seuil de signification est fixé à p<0,05.

## 4. Les Résultats

### 4.1 Le poids

Dans les groupes NPT, une perte de poids moyenne de  $5.8 \pm 1.9\%$  ( $p < 0.05$ ) est enregistrée durant la période d'alimentation parentérale, alors que le groupe témoin n'a pas perdu de poids.

Dès le premier mois, le groupe nourri par voie entérale montre une croissance pondérale supérieure aux groupes NPT ( $p < 0,01$ ). Cette différence persistera jusqu'à 3 mois. Au 3<sup>e</sup> mois, une différence se marque entre les groupes NPT. Le groupe PL montre une croissance pondérale inférieure ( $p < 0,01$ ) au groupe EL (cf. Figure 5).



**Figure 5 : Poids en fonction du temps après la naissance**

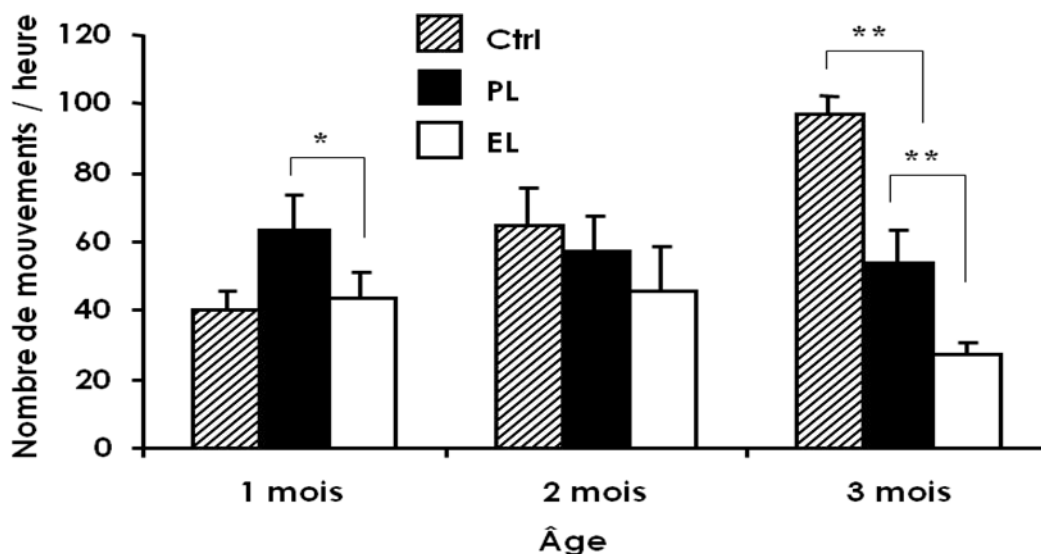
En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec TPN protégée de la lumière (PL) (n=6). En blanc : groupe avec TPN exposée à la lumière (EL) (n=6).  
\*\*= $p < 0,01$

### 4.2 Le nombre de mouvements par heure

Au 1<sup>er</sup> mois, le groupe témoin effectue moins de mouvement que le groupe PL. Au 3<sup>ème</sup> mois, le groupe témoin montre un nombre de mouvements supérieur aux

groupes NPT ( $p < 0,01$ ). Chez le groupe témoin, le nombre de mouvements augmente avec l'âge, alors que chez les groupes NPT, on ne note pas cette tendance.

Au 1<sup>er</sup> mois ( $p < 0,05$ ) et 3<sup>ème</sup> mois ( $p < 0,01$ ), le groupe PL effectue un nombre de mouvements supérieur au groupe EL (cf. Figure 6).

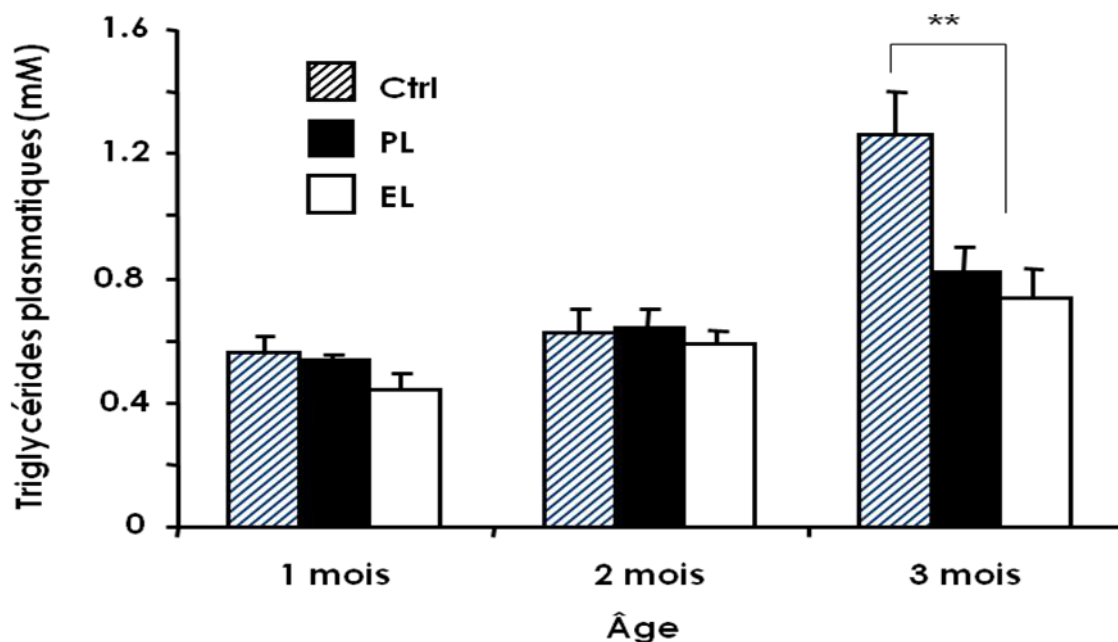


**Figure 6 : Nombre de mouvements par heure en fonction du temps**

En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=6). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*= $p < 0,01$ . \*= $p < 0,05$ .

### **4.3 Les triglycérides plasmatiques**

Aucune différence n'est notée entre les groupes durant les 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> mois. Au 3<sup>ème</sup> mois, le groupe nourri par alimentation entérale exclusive montre un taux de TG plasmatique supérieur aux groupes NPT ( $p < 0,01$ ). Aucune différence n'est notée entre les groupes NPT (cf. Figure 7). Chez le groupe témoin, les TG augmentent à 3 mois alors qu'ils restent stables chez les groupes NPT.

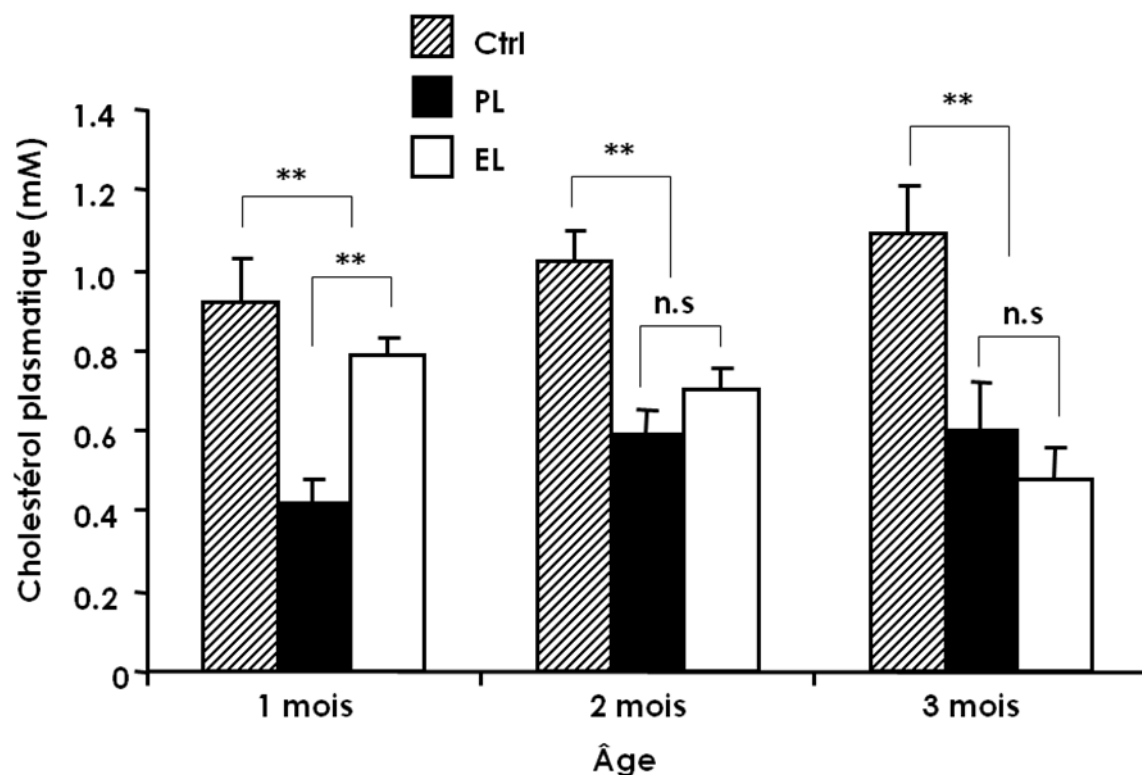


**Figure 7 : Triglycérides plasmatiques en fonction du temps après la naissance**

En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=6). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*= $p < 0,01$

#### 4.4 Le cholestérol plasmatique

Dès le premier mois, le groupe nourri par voie entérale exclusive a un cholestérol plasmatique plus élevé que les groupes NPT. Cette différence persiste durant les trois mois étudiés ( $p < 0,01$ ). Le taux de cholestérol plasmatique est plus faible dans le groupe PL par rapport au groupe EL uniquement au premier mois de vie (cf. Figure 8). Chez le groupe témoin, le cholestérol plasmatique semble stable en fonction du temps. Chez le groupe EL, il a tendance à diminuer et a tendance à augmenter dans le groupe PL.

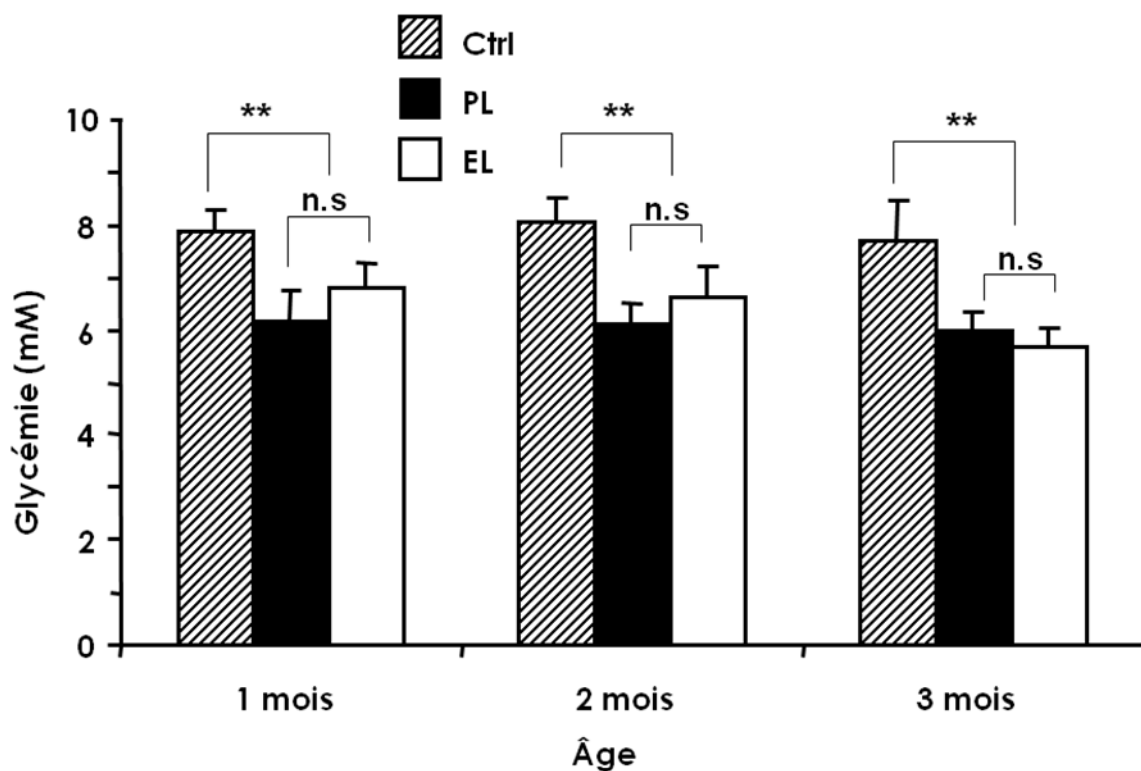


**Figure 8 : Cholestérol plasmatique en fonction du temps après la naissance**

En gris : groupe témoin (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=5). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*= $p < 0,01$ . n.s = non significatif

#### 4.5 La glycémie

Du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> mois de vie, la glycémie est plus élevée dans le groupe nourri par voie entérale exclusive ( $p < 0,01$ ) comparé aux groupes NPT (cf. Figure 9). La glycémie au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> mois ne montre pas de différence entre les groupes NPT.



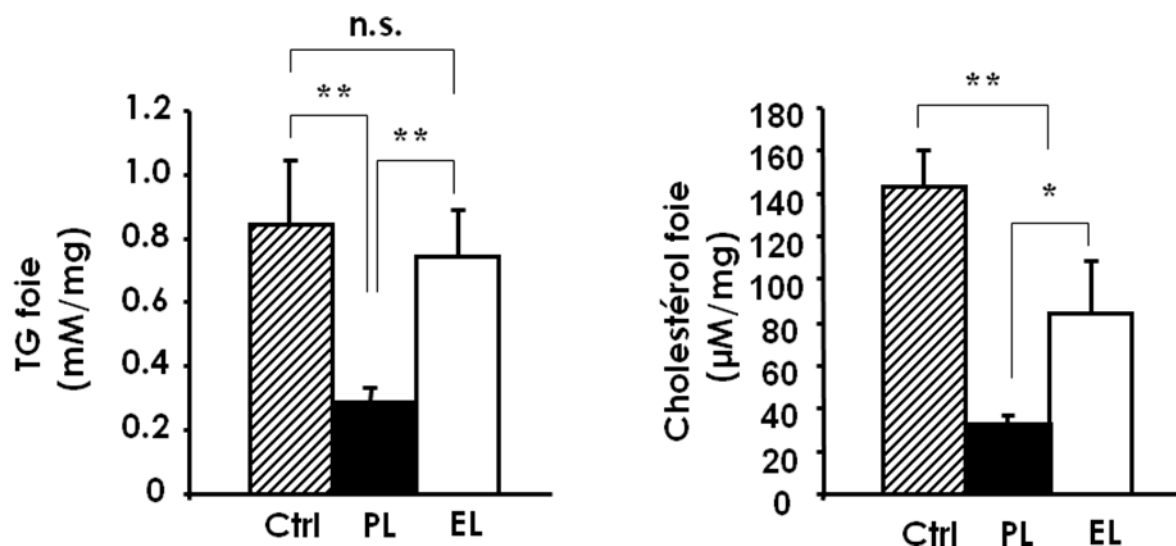
**Figure 9 : Glycémie plasmatique en fonction du temps après la naissance**

En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=6). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*= $p < 0,01$ . n.s = non significatif

#### **4.6 Les triglycérides et le cholestérol hépatiques**

À trois mois, les triglycérides hépatiques sont supérieurs dans le groupe nourri par voie entérale exclusive comparé au groupe PL ( $p < 0,01$ ). Par contre, il n'y a pas de différence entre le groupe témoin et le groupe EL. Le groupe PL a des triglycérides hépatiques inférieurs à ceux du groupe EL.

Au 3<sup>ème</sup> mois, le groupe témoin montre un taux de cholestérol hépatique supérieur aux groupes NPT ( $p < 0,01$ ). Le groupe PL a un cholestérol hépatique inférieur au groupe EL ( $p < 0,05$ ) (cf. Figure 10).



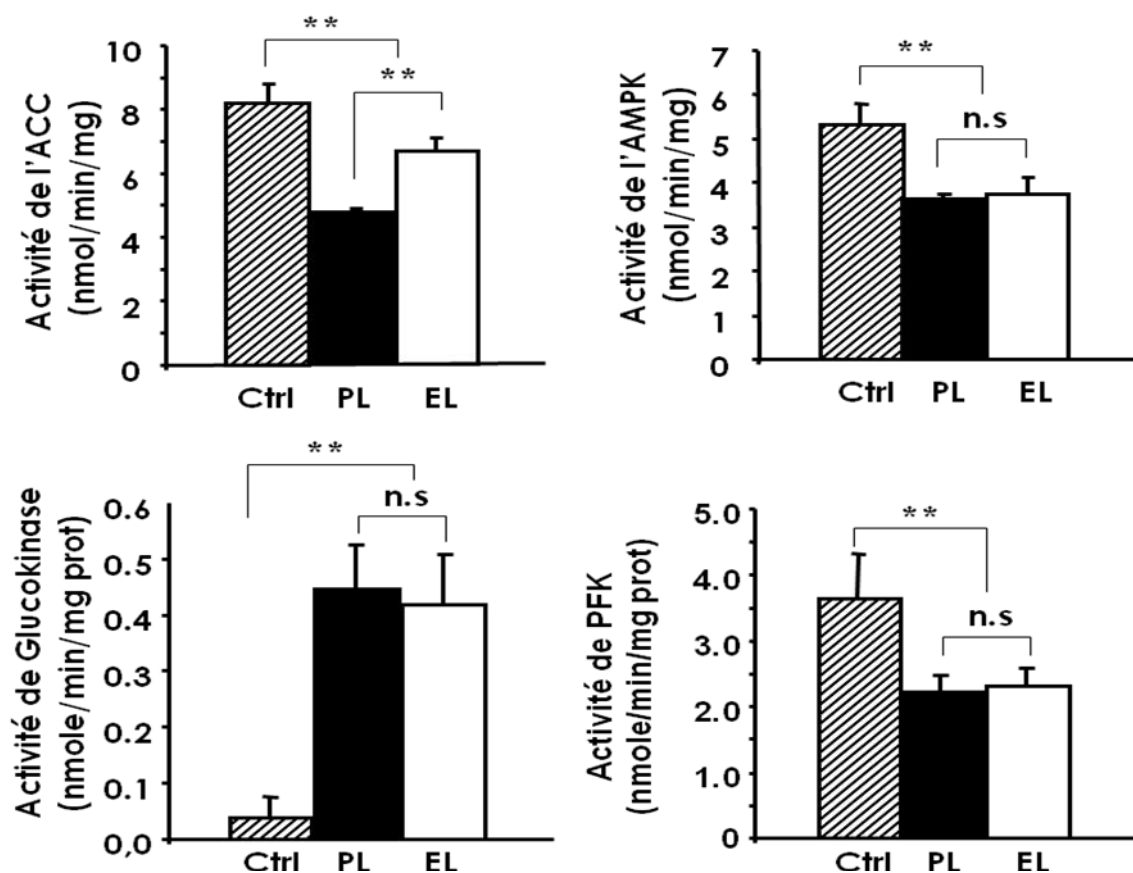
**Figure 10 : Triglycérides et cholestérol hépatiques à 3 mois**

En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=5). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*=p<0,01.\*=p<0,05. n.s = non significatif

#### **4.7 Les activités enzymatiques**

Les activités de l'acétyl CoA carboxylase (ACC), de la phosphofruktokinase (PFK), AMPK basale sont augmentés chez le groupe témoin par rapport au groupe NPT ( $p < 0,01$ ), seule l'activité de la glucokinase (GK) est diminuée ( $p < 0,01$ ). La seule différence notée entre les groupes NPT est une activité inférieure de l'ACC dans le groupe PL par rapport au groupe EL ( $p < 0,01$ ) (cf. Figure 11).





**Figure 11 : Activité des enzymes hépatiques à 3 mois**

En gris : groupe témoin (Ctrl) (n=4). En noir : groupe avec NPT protégée de la lumière (PL) (n=5). En blanc : groupe avec NPT exposée à la lumière (EL) (n=6). \*\*=p<0,01.n.s= non significatif

## **5. Discussion**

Nos travaux permettent de confirmer notre hypothèse selon laquelle le mode d'administration de l'alimentation néonatale a des effets sur le métabolisme glucidique et lipidique de l'adulte.

Nous discuterons d'abord de l'effet de la nutrition parentérale sur le métabolisme à long terme puis de l'effet de la lumière sur les solutions de NPT.

### **5.1 L'effet de la nutrition parentérale : Les groupes NPT comparés au groupe témoin**

Notre étude est la première à démontrer que la NPT donnée durant une courte période de la vie néonatale possède des effets à long terme sur la croissance et le métabolisme énergétique.

Comparativement au groupe contrôle (nourri par voie entérale), une diminution de la croissance pondérale est observée chez les groupes NPT sans qu'il n'y ait récupération à 3 mois. Cela s'accompagne d'une diminution de la glycémie à jeun, de la concentration plasmatique de cholestérol pour les 3 premiers mois de vie et d'une diminution des triglycérides au 3<sup>e</sup> mois de vie.

Notre étude montre qu'un poids plus important s'accompagne d'une glycémie, de TG et de cholestérol supérieur. Ces observations concordent avec ce qui a été décrit dans des études populationnelles qui témoignent du rôle déterminant du poids dans le contrôle des métabolismes lipidique et glucidique. Chez 629 adultes volontaires de 45 à 64 ans, l'influence du BMI (=poids/taille<sup>2</sup> utilisé comme une mesure du degré d'obésité) sur la glycémie et le bilan lipidique a été déterminée (Devroey et al., 2004). Les TG et la glycémie à jeun étaient plus élevés dans le groupe avec un BMI haut (>25 kg/m<sup>2</sup>) que dans celui avec un BMI bas (<25 kg/m<sup>2</sup>). Une réduction du poids grâce à un régime faible en calories et une augmentation de l'exercice physique chez 268 patients obèses a permis de réduire en l'espace de trois semaines leur BMI de 4.1 % et de réduire la glycémie et le cholestérol (de 14.9 et 16.7% respectivement)(Sartorio et al., 2001). Une autre évidence du rôle déterminant du poids dans le contrôle de la glycémie et du profil lipidique nous est donné par l'étude des patients obèses ayant eu recours à une chirurgie bariatrique (Vila et al., 2009), c'est à dire une chirurgie intestinale induisant une malabsorption et donc une perte pondérale secondaire. Une étude sur 115 patients

avec obésité morbide ( $BMI > 40 \text{ kg/m}^2$ ) a permis de mettre en évidence que la perte pondérale secondaire à l'intervention chirurgicale s'accompagne d'une diminution de la glycémie à jeun, de l'insulinémie (donc d'une réduction de la résistance à l'insuline) ainsi qu'une baisse des TG et du cholestérol sanguin. Nos données concordent donc avec ce qui est observé dans la littérature: le poids supérieur du groupe témoin peut expliquer également les valeurs plus élevées de glycémie, TG et cholestérol.

Les résultats de notre étude sont très similaires aux observations faites sur des souris et des rats dont l'apport calorique a été changé grâce à des manipulations du nombre de bébés par portée durant la période néonatale. Peter Hahn et al (Hahn, 1984) ont étudié des souris et des rats allaités (de J1 à J18) qui ont, dès le sevrage, été alimentés ad libitum jusqu'à J300. Chez les animaux dont les portées ont été sous-nutries en augmentant le nombre à 14 individus (portée normale : 7 bébés), on retrouve, à J300, un cholestérol plasmatique et une insulinémie abaissées par rapport au groupe où les portées ont été réduites à 4 individus et qui ont donc été sur-nutries en période d'allaitement. Aubert R et al (Aubert, Suquet, & Lemonnier, 1980) ont démontré grâce au changement du nombre de souriceaux par portée (portée de 4 individus pour la surnutrition, 9 pour groupe contrôle et 20 pour la sousnutrition néonatale), que, suite à la restriction calorique (dans les portées de 20 souriceaux) durant l'allaitement, persistaient des changements métabolique à long terme. La prise de poids est inversement proportionnelle au nombre d'individus par portée, la différence apparaît à 4 semaines et se marque avec le temps (jusqu'à 24 semaines, moment où les animaux sont sacrifiés). La glycémie est comparable entre les groupes mais l'insulinémie est supérieure dans le groupe avec surnutrition néonatale (portée de 4) et inférieure dans le groupe avec sousnutrition néonatale (portée de 20). Les différences induites par une restriction alimentaire néonatale concordent avec nos résultats. Les données rapportées dans la littérature suggèrent qu'une diminution de l'apport nutritionnel en période néonatale puisse être tenu responsable des conséquences observées à long terme. Dans notre étude, il y a plusieurs explications possibles. On sait d'une part que la période de transition de la NPT à l'alimentation entérale a été difficile: au 7<sup>e</sup> jour, l'alimentation intraveineuse est cessée dans les groupes NPT. À ce moment, les animaux doivent apprendre à s'alimenter par la bouche. Cette transition est faite brusquement et ne correspond pas à une situation observée en clinique où la quantité d'alimentation orale vs per os est quantifiée et où un changement graduel vers l'alimentation entérale permet d'éviter que les apports énergétiques ne diminuent. Les cochons d'Inde des groupes NPT ont vécu de manière difficile le passage à l'alimentation entérale comme en témoigne la mortalité importante survenue lors de cette phase transitionnelle. Il est

possible que les groupes NPT aient souffert de malnutrition durant cette phase de transition. Une partie des différences notées entre le groupe témoin et les groupes NPT représentent possiblement les conséquences à long terme d'un état de malnutrition. Cette situation suggère que les animaux du groupe NPT puissent avoir eu un apport calorique restreint durant cette période de transition à cause d'un ajustement insuffisant des apports caloriques. Une autre explication est que le groupe contrôle ait reçu un apport calorique supérieure au groupe NPT puisqu'il avait un accès ad libitum à l'alimentation entérale ce qui n'était pas le cas du groupe NPT, dont l'apport énergétique était fixe. Il se peut également qu'une altération de l'appétit ait été induite par la NPT ou encore qu'elle soit responsable d'une malabsorption. L'explication selon laquelle des différences d'apport calorique sont responsables des changements observés est d'autant plus probable que les changements observés suite à une période de restriction alimentaire néonatale sont similaires aux observations faites entre notre groupe témoin et les groupes NPT. Pour déterminer le mécanisme impliqué, une quantification de la prise alimentaire durant la première semaine de vie dans le groupe témoin doit être effectuée et comparée au contenu calorique amené par la NPT. La prise alimentaire durant la période de transition à J7 entre la NPT et l'alimentation entérale doit être quantifiée de manière très précise c'est à dire quotidiennement durant une semaine (de J7 à J14) et la prise alimentaire doit être soutenue. Une analyse des selles permettra d'exclure la présence d'une malabsorption, toutefois moins probable.

Notre étude montre que tous les groupes présentent un gain pondéral en fonction du temps. Le groupe témoin a une prise pondérale supérieure aux groupes NPT. Le gain pondéral est déterminé par l'équilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques déterminée par le métabolisme (Gardner & Rhodes, 2009). Le niveau d'activité physique (mesuré par le nombre de mouvements par heure) croît en fonction du temps dans le groupe témoin alors qu'il diminue dans les groupes NPT. La différence de poids observée entre les groupes n'est donc pas due au niveau d'activité physique et donc à des dépenses énergétiques supérieures. Il a été démontré chez le rat par Oscai et al. (Oscai & McGarr, 1978) que l'importance de prise alimentaire durant la période d'allaitement, comprenant les trois premières semaines de vie, déterminait sa prise alimentaire spontanée et son gain pondéral jusqu'à l'âge adulte, moment où sa croissance se stabilisait (jusqu'à 58 semaines après le sevrage). Grâce à des manipulations du nombre d'animaux par portée (4 pour le groupe surnutri et 22 pour les portées sousnutries), en alternant les périodes de restriction à la 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> semaine d'allaitement, ils a été démontré que chacune de ces périodes jouaient un rôle significatif sur la prise alimentaire et pondérale future et ceci malgré le fait que l'entier

des animaux ait accès dès le sevrage, à de l'alimentation ad libitum. Lorsque les animaux d'une portée ne sont soumis que durant une semaine à une restriction alimentaire, dans une portée de 22 animaux, puis placés dans une portée de 4 animaux pour les deux semaines d'allaitement restantes, ils présentent une prise alimentaire qui demeure inférieure durant l'entier de la période étudiée, c'est à dire jusqu'à 58 semaines après le sevrage. Ces travaux concordent avec notre étude qui démontre qu'une manipulation de la prise alimentaire durant une courte période néonatale dans la première semaine de vie induit des changements pondéraux persistants à long terme. Notre étude ne permet pas de déterminer si les différences pondérales et métaboliques observées sont uniquement secondaires à la différence du mode d'administration de l'alimentation en période néonatale ou si elles sont dues à l'effet combiné d'un changement induit par ces manipulations néonatales comme par exemple sur la quantité de calories consommées ultérieurement.

Une étude parue en 2009 (Kappeler et al., 2009) montre que la nutrition postnatale module l'axe somatotrope. Des souris dont l'apport alimentaire est réduit ou augmenté durant les deux semaines d'allaitement suite à une manipulation du nombre d'animaux par portée (10 dans le groupe avec sous-nutrition, 3 dans le groupe avec suralimentation, 6 dans le groupe contrôle) montrent une diminution ou une augmentation de la prise pondérale et staturale respectivement en comparaison avec le groupe contrôle. Cette différence persiste jusqu'à 12 mois de vie et ne se normalise pas malgré un accès, dès J 16 de vie, à l'alimentation ad libitum. Le niveau basal d'insuline à 3 et 12 mois est abaissé dans le groupe avec restriction alimentaire et augmenté dans le groupe suralimenté et le test d'hyperglycémie provoquée est altéré à 3 et 12 mois dans les deux groupes en comparaison avec le groupe contrôle. Le groupe avec surnutrition montre des concentrations sanguines de cholestérol et TG supérieures au groupe contrôle alors que le groupe ayant été restreint a un cholestérol abaissé. La restriction alimentaire s'accompagne d'une baisse de la GH (hormone de croissance) hypophysaire et de l'IGF-1 plasmatique ainsi que de l'ALS (protéine plasmatique augmentant la demi-vie biologique de l'IGF-1) à 3 mois et un an de vie. L'inverse est observé suite à une suralimentation. À J10, l'expression du GHRH est diminuée chez les souris restreintes et augmentées chez les suralimentées. À J20 cette différence disparaît et les auteurs suggèrent que le GHRH a induit une maturation et une prolifération des cellules somatotropes responsables des effets à long terme observés sur l'axe somatotrope. La GH, stimule la croissance et est hyperglycémiant (Behrman, Kliegman, & Jenson, 2004). Ainsi, la croissance pondérale altérée notée dans les groupes NPT et la glycémie à jeun diminuée pourrait être secondaire à une altération de l'axe somatotrope

avec diminution de l'IGF-1 et de la GH. Pour valider ceci, la GH et l'IGF-1 devront être mesurées.

Le groupe témoin montre une activité physique qui augmente en fonction du temps alors que chez les groupes NPT, elle diminue, rendant la différence entre le groupe témoin et NPT significative à 3 mois. Il n'y a que peu d'études qui démontrent que l'activité physique puisse être programmée par des manipulations néonatales. L'étude de Vickers et al. publiée en 2003 (Vickers, Breier, McCarthy, & Gluckman, 2003) est la première à mettre en évidence que des manipulations prénatales sont en mesure d'induire un comportement sédentaire chez l'adulte. La programmation foetale par sous-nutrition maternelle chez le rat (30% de ad libitum) durant la grossesse induit, à 14 mois de vie, un comportement sédentaire chez les rats issus de ces portées indépendamment de l'alimentation postnatale. Le comportement sédentaire est déjà présent à J35 avant que l'obésité ne devienne manifeste. Ces rats, comparés à un groupe contrôle, présentent également une hyperphagie et une prise de poids supérieure. Notre étude est donc une des rares à s'être intéressée au domaine de la programmation du comportement lié à l'activité physique.

Chez le groupe témoin, les concentrations sanguines et hépatiques de TG et de cholestérol sont supérieures à celle des groupes NPT (sauf pour les TG hépatiques qui ne montrent pas de différence entre le groupe témoin et NPT LE). Il est bien démontré qu'il existe une corrélation entre le niveau de LDN et la sécrétion de VLDL (Gibbons & Wiggins, 1995). Ceci explique pourquoi les groupes NPT, qui ont une lipogenèse de novo moins importante, possèdent également des TG et un cholestérol plasmatique inférieurs au groupe témoin. Nous devons mesurer les VLDL car les TG plasmatiques étant également véhiculés par d'autres lipoprotéines, ne reflètent pas directement le taux de VLDL. Il a aussi été démontré que la taille du pool cytoplasmique de TG hépatiques corrèle avec le taux de sécrétion des VLDL (Gibbons, Bartlett, Sparks, & Sparks, 1992). La concentration inférieure en TG plasmatiques des groupes NPT par rapport au groupe témoin est donc possiblement en rapport avec le taux inférieur de TG hépatiques. Il est connu que la production de VLDL plasmatiques est surtout dépendante de la quantité de substrat, principalement d'acides gras libres plasmatiques et n'est que minimalement sujette à un contrôle hormonal (Gibbons & Wiggins, 1995). On sait aussi que l'insuline augmente la concentration d'acides gras libres plasmatiques (Lewis, Carpentier, Adeli, & Giacca, 2002). Dans la suite de cette étude pilote, il sera donc intéressant d'obtenir la mesure du taux de VLDL et d'acides gras libres pour pouvoir dresser un tableau plus complet du métabolisme lipidique de nos animaux et des interactions entre les contenus

plasmatiques et hépatiques de triglycérides et de cholestérol et de la dynamique de leur transport par les lipoprotéines.

Chez nos animaux, l'altération de la croissance dans le groupe NPT s'accompagne d'une disponibilité réduite en substrats énergétiques sanguins; la glycémie, les TG et le cholestérol plasmatique sont inférieurs. En plus de ces changements métaboliques, les animaux nourris par NPT ont un niveau d'activité inférieur. Ainsi, ces animaux donnent l'impression d'évoluer avec un niveau de substrat abaissé, ne permettant ni une croissance optimale ni de l'énergie en quantité suffisante pour assurer un niveau d'activité équivalent au groupe contrôle.

Les groupes NPT montrent une diminution de l'activité de l'ACC, enzyme clef de la lipogénèse, et de la PFK, enzyme catalysant la première étape de la glycolyse et signant l'utilisation du glucose vers cette voie. Ces observations suggèrent une activité réduite de la glycolyse et de la lipogénèse dans les groupes NPT. Parallèlement à cela, la GK montre une activité augmentée, favorisant l'entrée de glucose dans la cellule. Une activité de GK plus élevée et une PFK basse suggèrent que le glucose sera stocké en glycogène (lynedjian, 2009). Afin de valider cela, nous devons doser le glycogène hépatique et le corrélérer avec l'activité de la GK. Chez des souris transgéniques avec une ou deux copies additionnelles du gène de la GK, la glycémie à jeun était réduite de 25 et 37% respectivement (Niswender, Shiota, Postic, Cherrington, & Magnuson, 1997). Suite à une hyperglycémie induite, les taux d'insuline sont abaissés chez les souris transgéniques. Ces résultats suggèrent que l'activité augmentée de la glucokinase puisse être responsable des valeurs glycémiques abaissées retrouvées chez les groupes NPT. Par contre, dans un modèle de rat avec surexpression de la GK dans le foie (induite au moyen d'un adénovirus codant pour la glucokinase hépatique) le taux de TG sanguins augmente et la concentration plasmatique de cholestérol reste inchangée et l'activité de l'ACC augmente (O'Doherty, Lehman, Telemaque-Potts, & Newgard, 1999). La différence d'activité de GK explique possiblement la glycémie mais n'est pas responsable des changements du métabolisme hépatique observés.

Chez les cochons d'Inde des groupes NPT, la glycémie ainsi que les concentrations plasmatiques de TG et de cholestérol sont abaissées par rapport au groupe témoin. Le niveau de substrat énergétique sanguin est donc abaissé. Il est connu que lorsque les substrats énergétiques sont abaissés (baisse de la glycémie et de l'insulinémie ainsi que de la concentration cellulaire de glucose) la glycolyse ainsi que la lipogénèse diminuent (Foufelle & Ferre, 2002). La conséquence est une diminution de la formation de malonylCoA par l'ACC et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras permettant la formation d'énergie sous forme d'ATP. En d'autres termes, le niveau

de LDN est le reflet de l'équilibre dans l'utilisation des acides gras pour la formation d'énergie versus pour leur stockage (Schwarz, Neese, Turner, Dare, & Hellerstein, 1995). Les animaux des groupes NPT montrent une diminution de l'activité de la PFK et de l'ACC qui reflètent possiblement une utilisation abaissée de la LDN dans le cadre d'une balance énergétique ne favorisant pas les voies anaboliques (Finn & Dice, 2006). Le groupe témoin, chez qui les substrats énergétiques sont en quantité augmentée favorise la mise en réserve du glucose sous forme de TG au niveau hépatique (par lipogenèse de novo contrôlée par l'ACC grâce à l'utilisation de l'acétyl-CoA formé par la glycolyse sous contrôle de la PFK). L'insuline, molécule régulatrice clé des voies métaboliques de la lipogenèse et de la glycolyse devrait être mesurée, car son niveau détermine l'activité enzymatique de la glycolyse et de la lipogenèse de novo et pourrait donc expliquer les différences observées.

La différence de poids entre les groupes témoin et NPT est importante. La croissance est tributaire de processus anaboliques. Elle nécessite donc de l'énergie. La disponibilité de substrats énergétiques est nécessaire à la prise pondérale et à la croissance. Les groupes NPT possèdent des réserves énergétiques en quantité inférieure. Comme nous en avons parlé, leur métabolisme enzymatique montre un équilibre énergétique favorisant les voies cataboliques par rapport aux voies anaboliques. Le foie joue un rôle clef de régulateur du niveau énergétique. Lorsque la balance énergétique est négative, comme en cas de jeûne, les voies cataboliques sont favorisées menant à la libération de substrats énergétiques pour les tissus. Inversement, si la balance est positive, comme en état postprandial, les voies anaboliques sont favorisées menant à la formation de réserves énergétiques. Le métabolisme hépatique reflète donc le niveau relatif d'anabolisme et de catabolisme. Comme nous l'avons vu, la balance énergétique du groupe témoin est favorable à l'anabolisme tandis que celle des groupes NPT est favorable au catabolisme. Nous pensons que c'est la raison pour laquelle les groupes NPT montrent une croissance inférieure. Celle-ci est le reflet d'une formation de tissus inférieure dans le contexte d'une balance énergétique défavorable ne favorisant pas la favorisation des voies anaboliques par rapport aux voies cataboliques. À l'inverse, le groupe témoin montre une croissance supérieure, reflet d'un anabolisme plus important. La mesure de la prise alimentaire nous permettra de déterminer si les changements enzymatiques observés sont primaires ou secondaires au manque d'apport énergétique. S'ils sont secondaires à des changements d'apports, les voies régulatrices de l'appétit pourront être explorées. La calorimétrie indirecte pourra nous renseigner sur les dépenses énergétiques ainsi que sur la nature des substrats énergétiques (glucose vs lipides) utilisés



grâce à la mesure du quotient respiratoire. Nous espérons ainsi orienter les recherches futures vers la compréhension des changements métaboliques observés.

## **5.2 L'effet de l'exposition ou de la protection de la lumière sur les solutions de NPT: Les**

### **groupes NPT comparés**

Notre étude est la première à démontrer que la NPT donnée sur une courte période néonatale a des effets différents sur le métabolisme de l'adulte selon qu'elle ait été ou non protégée de la lumière. Les potentielles implications de nos travaux sont majeures car, malgré le fait que la NPT est utilisée quotidiennement dans les unités néonatales et que sa protection de la lumière pourrait être assurée si elle s'avérait bénéfique, les données sur son effet à long terme sont inexistantes.

Les deux groupes d'animaux ont été soumis exactement aux mêmes conditions et donc, contrairement à la comparaison avec le groupe témoin chez qui la prise alimentaire induit un biais, ces deux groupes ne diffèrent que par les changements de composition de NPT induits par l'exposition ou non à la lumière.

Chez les animaux ayant reçu un NPT protégée de la lumière (PL) on note que, à 3 mois, le poids, les TG et le cholestérol hépatique sont diminués et que l'activité de l'ACC est abaissée par rapport au groupe NPT exposée à la lumière (EL). Les animaux dont la nourriture a été exposée à la lumière (NPT EL) ont, au 3<sup>e</sup> mois, une prise pondérale supérieure aux animaux dont la nourriture a été protégée de la lumière (NPT PL). Donc l'effet sur le poids ne devient manifeste qu'à long terme, à distance de la période d'infusion de la NPT qui a lieu uniquement dans la première semaine.

L'exposition à la lumière de la NPT a un double effet: elle produit des peroxydes (le 90% de peroxyde d'hydrogène (Helbock et al., 1993), le reste est composé de peroxydes organiques(Laborie et al., 1998)) et diminue la concentration des vitamines antioxydantes diminuant par conséquent les défenses antioxydantes (Lavoie et al., 2004; Haas et al., 2002). Une étude menée récemment au laboratoire (Turcot et al., 2009) a permis de mettre en évidence l'effet à long terme d'une diète déficiente en molécules antioxydantes sans exposition à des peroxydes exogènes. Des cochons d'Inde ont été exposés de J3 à J7 à une diète per os soit régulière, soit déficiente en substances antioxydantes puis ont reçu une diète standard ad libitum. Donc le modèle, le moment et la durée d'exposition sont identique à ceux de notre étude. Aucune différence de poids n'a été observée jusqu'à 14 semaines. Le groupe avec diète déficiente a des TG plasmatiques (à 3,11 et 14 semaines) et une glycémie diminuée (à 11 et 13 semaines) ainsi qu'une activité de l'ACC à 14 semaines plus basse. Dans le foie des animaux avec

diète déficiente, un changement du métabolisme du glutathion vers un état plus oxydé a été noté avec des concentrations de GSH abaissées (à 1 et 14 semaines). Les taux de glucose et de TG plasmatiques sont expliqués par la variation du potentiel redox hépatique. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés dans notre étude puisque le groupe NPT EL chez qui la concentration en molécules antioxydantes a été abaissée par l'exposition à la lumière ne montre aucun des changements retrouvés dans le groupe avec diète déficiente en molécules antioxydantes. On ne peut donc pas expliquer les différences retrouvées entre les groupes NPT EL et PL par la diminution des vitamines antioxydantes induite par l'exposition à la lumière. L'infusion des peroxydes exogènes par la NPT semble donc jouer un rôle dans la genèse des différences observées.

Les TG et le cholestérol hépatique sont augmentés dans le groupe NPT EL par rapport au groupe NPT PL. De plus, le groupe NPT EL possède une activité d'ACC hépatique supérieure, ce à quoi on s'attend puisqu'elle est une enzyme clé de la lipogenèse et génère donc la formation de TG. L'augmentation de la lipogenèse avait déjà été mise en évidence durant la période néonatale d'infusion de la NPT chez le cochons d'Inde (à J7) et chez les nouveau-nés prématurés (Khashu et al., 2008). Notre étude montre que ces changements persistent bien au delà de la période d'infusion puisqu'ils sont présents à 3 mois de vie. Le fait que ces changements se retrouvent à distance de la période d'infusion de la NPT ne permet pas de déterminer s'ils sont secondaires à l'exposition ou non à la lumière en période néonatale ou s'ils sont dus à l'effet combiné d'un changement induit par ces manipulations néonatales. Iritani et al. ont démontré que chez le rat, après un jeûne, l'activité de l'ACC et le taux de TG hépatique augmentent avec la quantité de calories d'une diète riche en hydrates de carbones (Iritani, 1992). Donc le poids et les TG hépatiques supérieurs du groupe NPT LE par rapport au groupe NPT LP pourraient s'expliquer par des apports caloriques supérieurs dans ce groupe, cette explication devra être validée par la mesure de la prise alimentaire durant l'entier de la période étudiée. Des études au laboratoire ont permis de mettre en évidence que, durant la période d'infusion, les peroxydes formés en présence de lumière (Knafo et al., 2005) sont impliqués dans l'activation de l'ACC et stimulent la lipogenèse hépatique. Étant donné le rôle dévolu à ces peroxydes induits par la lumière durant la période d'infusion de la NPT chez notre modèle de cochon d'Inde, on peut s'attendre à ce qu'ils contribuent également aux changements métaboliques à long terme. Pour vérifier cette hypothèse, un groupe nourri par voie entérale et recevant parallèlement durant la première semaine, une infusion titrées de peroxydes correspondante à celle que reçoivent les groupes NPT EL et PL pourrait être comparé à un groupe nourri par voie entérale et recevant du sérum physiologique.

À J7, lors de l'arrêt de la NPT, il avait été précédemment montré par Lavoie *et al.* que les TG plasmatiques sont plus élevés dans le groupe EL. Notre étude démontre que cet effet disparaît à l'arrêt de la NPT puisque, par la suite, les TG plasmatiques sont comparables entre les groupes. À trois mois, alors que les TG et le cholestérol plasmatiques sont identiques entre les groupes les TG, le cholestérol hépatique et l'activité de l'ACC dans le foie sont augmentés dans le groupe NPT EL par rapport au groupe PL. Donc malgré une augmentation de la lipogenèse hépatique, le taux de TG sanguin demeure identique. Cette observation paradoxale a été décrite précédemment par Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2007) qui ont mis en évidence des différences du métabolisme lipidique hépatique en comparant des rats dont la mère a reçu une diète restreinte en calories (de 25%) durant la grossesse avec des rats dont la mère a reçu une diète ad libitum. Après la naissance, l'entier des animaux sont nourris ad libitum et à J30, les TG et le cholestérol hépatiques sont dosés. Chez les mâles, malgré l'augmentation du contenu en TG et en cholestérol hépatiques dans le groupe ayant reçu une diète restreinte, le contenu plasmatique demeure comparable à celui du groupe contrôle.

Étudier des animaux à plus long terme pourrait également nous renseigner sur la portée des changements métaboliques observés et potentiellement nous aiguiller vers la supériorité d'un mode d'administration par rapport à l'autre. La différence de poids se marque au troisième mois. On peut donc postuler sur la possibilité qu'une partie des changements métaboliques qu'elle reflète ne deviennent manifestes qu'à plus long terme. Devant des changements métaboliques importants touchant au poids et au métabolisme lipidique du foie, il ne serait pas étonnant que si les animaux étaient étudiés à plus long terme, une différence dans le profil lipidique sanguin se manifeste entre les groupes NPT.

Comme discuté précédemment, le niveau de LDN, reflété par l'activité de l'ACC et le contenu hépatique en TG est un indicateur de l'équilibre dans l'utilisation des acides gras pour la formation d'énergie versus pour leur stockage (Schwarz *et al.*, 1995). Ceci suggère que le métabolisme du groupe EL est davantage orienté vers la formation de TG que vers leur utilisation pour la formation d'énergie par  $\beta$ -oxydation. Par contre, le groupe PL a davantage tendance à utiliser les TG comme source d'énergie plutôt que pour leur estérification. La favorisation des voies anaboliques dans le groupe EL pourrait, comme dans le cas du groupe témoin, expliquer la croissance pondérale supérieure observée dans ce groupe par rapport au groupe LP. Nous avons discuté précédemment du fait que la NPT dans la première semaine semble induire à long terme, une baisse du métabolisme comme en témoigne le poids inférieur, la quantité de substrats

énergétiques abaissée (glycémie, TG, cholestérol hépatique) ainsi que la quantité de mouvement diminuée par rapport au groupe témoin. Chez le groupe NPT PL, le poids, les TG et le cholestérol hépatique sont abaissés par rapport au groupe NPT EL suggérant que leur métabolisme est plus diminué que celui du groupe NPT EL. Nos résultats indiquent que la protection de la lumière peut avoir un effet délétère en baissant davantage encore le métabolisme (déjà abaissé par la NPT).

La protection ou l'exposition de la NPT à la lumière détermine des changements métaboliques à long terme qui vont à l'opposé de notre hypothèse selon laquelle ils seraient majorés par son exposition à la lumière. Nous observons la contraire, le poids est davantage abaissé et les TG et le cholestérol hépatiques sont inférieurs à ceux du groupe contrôle suggérant un métabolisme abaissé. Notre étude ne permet toutefois pas de conclure à la supériorité d'un mode d'administration par rapport à l'autre. Les résultats obtenus ne permettent pas d'orienter le suivi clinique des anciens prématurés ayant reçu de la NPT (qui dans presque toutes les unités est exposée à la lumière ou très partiellement protégée)(Sherlock & Chessex, 2009). L'originalité de notre étude réside dans l'intérêt qu'elle suscite pour des études humaines. Le fait de mettre en évidence des changements durables chez l'animal aide à la réalisation de telles études. La cohorte d'anciens prématurés ayant intégré une étude sur les effets immédiats de la NPT et ayant donc été divisés en deux groupes NPT LE et LP pourrait être mise à contribution avec une visite médicale portant sur la mesure de valeurs anthropométriques (poids, taille, BMI) mesure de la TA et une prise de sang avec détermination du profil lipidique complet, de la glycémie et de l'insulinémie.

### **5.3 Limitations de notre étude**

Seuls des cochons d'Inde mâles sont étudiés dans ce travail. On sait que certains changements sont programmés différemment en fonction du sexe. Dans l'étude de Choi et al. décrite précédemment, des différences entre les sexes ont été observées. Chez les femelles, le taux de cholestérol hépatique est abaissé et le contenu en TG est identique aux contrôles tandis que le foie des mâles montre une augmentation des contenus en TG et en cholestérol par rapport aux contrôles. Une étude de Lucas et al. (Lucas, Baker, Desai, & Hales, 1996) effectuée sur des rats issus de portées dont la mère a, durant la grossesse et la lactation, été mise sous une diète restreinte en protéines montre que, à 6 mois, l'effet de la diète restreinte sur le cholestérol et les HDL (qui sont abaissés dans le groupe restreint en protéines en comparaison du groupe contrôle) n'était mis en

évidence que chez les mâles. Les mâles et les femelles montrent une baisse des TG plasmatiques dans le groupe restreint en protéines comparé au groupe contrôle mais celle-ci est plus marquée chez les mâles. Ces études montrent donc que le métabolisme lipidique peut être programmé différemment en fonction du sexe. Nos travaux ne peuvent donc pas être extrapolés aux femelles.

Une autre limitation est le choix du groupe témoin qui, idéalement devrait représenter une situation physiologique et de plus subir les mêmes manipulations que les groupes NPT hormis celle étudiée, c'est à dire l'administration de NPT. Ces conditions ne sont malheureusement pas respectées car, dès J3, les cochons d'Inde sont séparés de leur mère. Cette séparation implique un sevrage précoce qui ne correspond pas à une situation physiologique car habituellement le sevrage a lieu à 2-3 semaines (Terrill & Clemons, 1998). Il a été démontré que chez le rat un sevrage précoce induisait, à l'âge adulte, une augmentation des niveaux de cholestérol plasmatique (Koldovsky, Hahn, Hromadova, Krecek, & Macho, 1995) comparé à un groupe sevré plus tardivement. Ceci suggère que le métabolisme lipidique puisse être influencé par le sevrage précoce du groupe alimenté par voie entérale. Pour obtenir un témoin correspondant davantage à une condition physiologique, nous devrions suivre des cochons d'Inde qui continuent à être allaités.

Comme nous l'avons décrit précédemment, au 7<sup>e</sup> jour, l'alimentation intraveineuse est cessée dans les groupes NPT. À ce moment, les animaux doivent apprendre à s'alimenter par la bouche. Cette transition est faite brusquement et a été vécue difficilement comme en témoigne la mortalité importante survenue lors de cette phase transitionnelle. Il est possible que les groupes NPT aient souffert de malnutrition durant cette phase de transition. La sous-nutrition en période néonatale induit des changements identiques à ceux retrouvés dans les groupes NPT comparé au groupe témoin rendant cette explication plausible.

Une autre différence est la présence, dans les groupes NPT, d'un cathéter durant la première semaine de vie et l'infusion d'alimentation ayant été en contact avec la tubulure. On sait que les composés de la tubulure peuvent être responsables de changements histologiques hépatiques (Loff et al., 2007) et on peut donc suspecter qu'un biais soit induit par l'infusion de soluté à travers le cathéter.

Par contre, la comparaison des groupes NPT entre eux ne souffre d'aucun des ces biais et est au cœur du débat sur le mode d'administration de la NPT dans les unités néonatales.

## **6. Conclusion**

La nutrition en période néonatale et son influence sur le futur adulte a été mise en évidence durant ces dernières années. À notre connaissance, notre étude est la première à explorer l'effet de l'alimentation parentérale totale sur le métabolisme et la croissance à long terme. Bien que ce mode d'alimentation soit utilisé quotidiennement dans les unités néonatales et que sa protection de la lumière pourrait être assurée si elle s'avérait bénéfique, les données sur son effet à long terme sont inexistantes. L'originalité de notre projet est donc de démontrer pour la première fois que la protection de la NPT de la lumière a un impact à long terme.

Nous avons montré que l'alimentation parentérale possède un effet important sur la croissance à long terme et engendre des perturbations du métabolisme lipidique et glucidique. Les substrats énergétiques circulants sont en quantité moindre chez les animaux nourris par NPT ce qui suggère que l'équilibre métabolique se déplace vers un catabolisme plus marqué ou vers un changement de l'anabolisme.

Notre étude indique que la protection de la lumière de la NPT néonatale influence le métabolisme hépatique de manière significative à long terme. On sait que le foie est l'organe qui régule principalement le métabolisme énergétique et que l'activité des enzymes qu'il abrite est régulée de manière à s'adapter aux besoins énergétiques de l'organisme. Les différences de contenu en TG et cholestérol secondaire à la protection de la lumière de la NPT sont donc le reflet de mécanismes régulateurs complexes qui impliquent l'équilibre métabolique de l'organisme entier. Une compréhension plus poussée de ces changements est nécessaire afin de la corroborer chez l'humain et ainsi permettre l'élaboration de recommandations éclairées sur une éventuelle protection de l'alimentation parentérale de la lumière.

Notre étude esquisse certaines hypothèses étiologiques aux changements observés et propose des investigations supplémentaires. Il est nécessaire de poursuivre ces études afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces observations et ultimement, d'optimiser la prise en charge et le suivi à long terme des nouveau-nés les plus fragiles et les plus immatures.

## **Bibliographie**

- Arikan, S., Konukoglu, D., Arikan, C., Akcay, T., & Davas, I. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol.Obstet.Invest*, 51, 145-149.
- Aubert, R., Suquet, J. P., & Lemonnier, D. (1980). Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. *J.Nutr.*, 110, 649-661.
- Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C., & Simmonds, S. J. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*, 301, 259-262.
- Barker, D. J., Eriksson, J. G., Forsen, T., & Osmond, C. (2002). Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int.J.Epidemiol.*, 31, 1235-1239.
- Barker, D. J., Martyn, C. N., Osmond, C., Hales, C. N., & Fall, C. H. (1993). Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ*, 307, 1524-1527.
- Barker, D. J., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B., & Simmonds, S. J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2, 577-580.
- Baserga, M. C. & Sola, A. (2004). Intrauterine growth restriction impacts tolerance to total parenteral nutrition in extremely low birth weight infants. *J.Perinatol.*, 24, 476-481.
- Behrman, Kliegman, & Jenson (2004). Hypopituitarism. In *Nelson Textbook of Pediatrics* (pp. 1847-1853). Saunders.
- Belli, D. C., Albrecht, R., La Scala, G. C., Desjeux, J. F., & Pelissier, M. A. (2003). Homocysteine prevents total parenteral nutrition (TPN)-induced cholestasis without changes in hepatic oxidative stress in the rat. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, 36, 200-205.
- Block, G., Dietrich, M., Norkus, E. P., Morrow, J. D., Hudes, M., Caan, B. et al. (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am.J.Epidemiol.*, 156, 274-285.
- Boonstra, J. & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1-13.
- Burns, S. P., Desai, M., Cohen, R. D., Hales, C. N., Iles, R. A., Germain, J. P. et al. (1997). Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring

of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J.Clin.Invest*, 100, 1768-1774.

Cai, W., Wu, J., Hong, L., Xu, Y., Tang, Q., & Shi, C. (2006). Oxidative injury and hepatocyte apoptosis in total parenteral nutrition-associated liver dysfunction. *J.Pediatr.Surg.*, 41, 1663-1668.

Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.*, 59, 527-605.

Chessex, P., Harrison, A., Khashu, M., & Lavoie, J. C. (2007). In preterm neonates, is the risk of developing bronchopulmonary dysplasia influenced by the failure to protect total parenteral nutrition from exposure to ambient light? *J.Pediatr.*, 151, 213-214.

Chessex, P., Khashu, M., Harrison, A., Hosking, M., Sargent, M., & Lavoie, J. C. (2009). Early life events, sex, and arterial blood pressure in critically ill infants. *Pediatr.Crit Care Med.* Jul 11.

Choi, G. Y., Tosh, D. N., Garg, A., Mansano, R., Ross, M. G., & Desai, M. (2007). Gender-specific programmed hepatic lipid dysregulation in intrauterine growth-restricted offspring. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 196, 477.

Christensen, R. D., Henry, E., Wiedmeier, S. E., Burnett, J., & Lambert, D. K. (2007). Identifying patients, on the first day of life, at high-risk of developing parenteral nutrition-associated liver disease. *J.Perinatol.*, 27, 284-290.

Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J.Biol.Chem.*, 262, 9895-9901.

Desai, M., Byrne, C. D., Zhang, J., Petry, C. J., Lucas, A., & Hales, C. N. (1997). Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am.J.Physiol*, 272, G1083-G1090.

Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A., & Hales, C. N. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem.Soc.Trans.*, 23, 331-335.

Desai, M. & Hales, C. N. (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.*, 72, 329-348.



Devroey, D., De, S. N., Coigniez, P., Vandevoorde, J., Kartounian, J., & Betz, W. (2004). Correlations between lipid levels and age, gender, glycemia, obesity, diabetes, and smoking. *Endocr.Res.*, *30*, 83-93.

Dolinsky, V. W., Douglas, D. N., Lehner, R., & Vance, D. E. (2004). Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem.J.*, *378*, 967-974.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, *82*, 47-95.

Duff, D. A. & Snell, K. (1982). Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *J.Nutr.*, *112*, 1057-1066.

Eriksson, J. G., Forsen, T., Tuomilehto, J., Osmond, C., & Barker, D. J. (2001). Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ*, *322*, 949-953.

Eriksson, J. G., Lindi, V., Uusitupa, M., Forsen, T. J., Laakso, M., Osmond, C. et al. (2002). The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on insulin sensitivity and insulin metabolism interact with size at birth. *Diabetes*, *51*, 2321-2324.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, *52*, 1-8.

Fall, C. H., Barker, D. J., Osmond, C., Winter, P. D., Clark, P. M., & Hales, C. N. (1992). Relation of infant feeding to adult serum cholesterol concentration and death from ischaemic heart disease. *BMJ*, *304*, 801-805.

Fernandez, M. L. (2001). Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J.Nutr.*, *131*, 10-20.

Finn, P. F. & Dice, J. F. (2006). Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*, *22*, 830-844.

Forsen, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Osmond, C., & Barker, D. J. (1999). Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*, *319*, 1403-1407.

Forsen, T., Osmond, C., Eriksson, J. G., & Barker, D. J. (2004). Growth of girls who later develop coronary heart disease. *Heart*, *90*, 20-24.

Foufelle, F. & Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem.J.*, *366*, 377-391.

Fowden, A. L. & Hill, D. J. (2001). Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br.Med.Bull.*, *60*, 123-142.

Gardner, D. S. & Rhodes, P. (2009). Developmental origins of obesity: programming of food intake or physical activity? *Adv.Exp.Med.Biol.*, *646*, 83-93.

Gibbons, G. F., Bartlett, S. M., Sparks, C. E., & Sparks, J. D. (1992). Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem.J.*, *287 ( Pt 3)*, 749-753.

Gibbons, G. F. & Wiggins, D. (1995). The enzymology of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *Biochem.Soc.Trans.*, *23*, 495-500.

Haas, C., Genzel-Boroviczeny, O., & Koletzko, B. (2002). Losses of vitamin A and E in parenteral nutrition suitable for premature infants. *Eur.J.Clin.Nutr.*, *56*, 906-912.

Hahn, P. (1984). Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *J.Nutr.*, *114*, 1231-1234.

Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C. et al. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, *303*, 1019-1022.

Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr.Rev.*, *52*, 253-265.

Heffetz, D., Rutter, W. J., & Zick, Y. (1992). The insulinomimetic agents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem.J.*, *288 ( Pt 2)*, 631-635.

Hehner, S. P., Breikreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M. L. et al. (2000). Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J.Immunol.*, *165*, 4319-4328.

Helbock, H. J., Motchnik, P. A., & Ames, B. N. (1993). Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants. *Pediatrics*, *91*, 83-87.

Hong, L., Wu, J., & Cai, W. (2007). Glutathione decreased parenteral nutrition-induced hepatocyte injury in infant rabbits. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, *31*, 199-204.

Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Scraufstatter, I. U., Cochrane, C. G., Kunz, S., & Vosbeck, K. (1995). Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic.Biol.Med.*, *19*, 31-37.

Iritani, N. (1992). Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *Eur.J.Biochem.*, *205*, 433-442.

Ilyedjian, P. B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol.Life Sci.*, *66*, 27-42.

Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., & Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol.Sci.*, *65*, 166-176.

Kamath, U., Rao, G., Raghothama, C., Rai, L., & Rao, P. (1998). Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr.*, *87*, 676-679.

Kappeler, L., De Magalhaes, F. C., Leneuve, P., Xu, J., Brunel, N., Chatziantoniou, C. et al. (2009). Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. *Endocrinology*, *150*, 314-323.

Kaufman, S. S., Gondolesi, G. E., & Fishbein, T. M. (2003). Parenteral nutrition associated liver disease. *Semin.Neonatol.*, *8*, 375-381.

Kelly, D. A. (1998). Liver complications of pediatric parenteral nutrition--epidemiology. *Nutrition*, *14*, 153-157.

Khan, I. Y., Taylor, P. D., Dekou, V., Seed, P. T., Lakasing, L., Graham, D. et al. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension*, *41*, 168-175.

Khashu, M., Harrison, A., Lalari, V., Gow, A., Lavoie, J. C., & Chessex, P. (2006). Photoprotection of parenteral nutrition enhances advancement of minimal enteral nutrition in preterm infants. *Semin.Perinatol.*, *30*, 139-145.

Khashu, M., Harrison, A., Lalari, V., Lavoie, J. C., & Chessex, P. (2009). Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of blood glucose and triglyceride in preterm neonates. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed.*, Mar;94(2):F111-5

Kind, K. L., Clifton, P. M., Grant, P. A., Owens, P. C., Sohlstrom, A., Roberts, C. T. et al. (2003). Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 284, R140-R152.

Kind, K. L., Clifton, P. M., Katsman, A. I., Tsiounis, M., Robinson, J. S., & Owens, J. A. (1999). Restricted fetal growth and the response to dietary cholesterol in the guinea pig. *Am.J.Physiol*, 277, R1675-R1682.

Kind, K. L., Simonetta, G., Clifton, P. M., Robinson, J. S., & Owens, J. A. (2002). Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp.Physiol*, 87, 469-477.

Knafo, L., Chessex, P., Rouleau, T., & Lavoie, J. C. (2005). Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin.Chem.*, 51, 1462-1471.

Koldovsky, O., Hahn, P., Hromadova, M., Krecek, J., & Macho, L. (1995). Late effects of early nutritional manipulations. *Physiol Res.*, 44, 357-360.

Krohn, K. & Koletzko, B. (2006). Parenteral lipid emulsions in paediatrics. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care*, 9, 319-323.

Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S., & Lopaschuk, G. D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J.Biol.Chem.*, 270, 17513-17520.

Kumpf, V. J. (2006). Parenteral nutrition-associated liver disease in adult and pediatric patients. *Nutr.Clin.Pract.*, 21, 279-290.

Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C., & Fleming, T. P. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, 127, 4195-4202.

Laborie, S., Lavoie, J. C., & Chessex, P. (1998). Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr.Res.*, *43*, 601-606.

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

Lavoie, J. C., Belanger, S., Spalinger, M., & Chessex, P. (1997). Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics*, *99*, E6.

Lavoie, J. C. & Chessex, P. (1997). Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic.Biol.Med.*, *23*, 648-657.

Lavoie, J. C., Chessex, P., Gauthier, C., Levy, E., Alvarez, F., St-Louis, P. et al. (2005). Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, *41*, 108-114.

Lavoie, J. C., Chessex, P., Rouleau, T., Migneault, D., & Comte, B. (2004). Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. *Clin.Chem.*, *50*, 135-140.

Lavoie, J. C., Rouleau, T., & Chessex, P. (2004). Interaction between ascorbate and light-exposed riboflavin induces lung remodeling. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, *311*, 634-639.

Lavoie, J. C., Rouleau, T., Gagnon, C., & Chessex, P. (2002). Photoprotection prevents TPN-induced lung procollagen mRNA in newborn guinea pigs. *Free Radic.Biol.Med.*, *33*, 512-520.

Law, C. M., de, S. M., Osmond, C., Fayers, P. M., Barker, D. J., Cruddas, A. M. et al. (1993). Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ*, *306*, 24-27.

Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., & Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr.Rev.*, *23*, 201-229.

Loff, P. D., Subotic, U., Oulmi-Kagermann, J., Kranzlin, B., Reinecke, M. F., & Staude, C. (2007). Diethylhexylphthalate extracted by typical newborn lipid emulsions from polyvinylchloride infusion systems causes significant changes in histology of rabbit liver. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, *31*, 188-193.

- Loff, S., Subotic, U., Reinicke, F., Wischmann, H., & Brade, J. (2004). Extraction of diethylhexyl-phthalate from perfusion lines of various material, length and brand by lipid emulsions. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, 39, 341-345.
- Lucas, A., Baker, B. A., Desai, M., & Hales, C. N. (1996). Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *Br.J.Nutr.*, 76, 605-612.
- Luo, Z. C., Fraser, W. D., Julien, P., Deal, C. L., Audibert, F., Smith, G. N. et al. (2006). Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med.Hypotheses*, 66, 38-44.
- Makinde, A. O., Gamble, J., & Lopaschuk, G. D. (1997). Upregulation of 5'-AMP-activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circ.Res.*, 80, 482-489.
- McCance, D. R., Pettitt, D. J., Hanson, R. L., Jacobsson, L. T., Knowler, W. C., & Bennett, P. H. (1994). Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ*, 308, 942-945.
- Meagher, E. A. & FitzGerald, G. A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic.Biol.Med.*, 28, 1745-1750.
- Merritt, R. J. (1986). Cholestasis associated with total parenteral nutrition. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, 5, 9-22.
- Mongkolsuk, S. & Helmann, J. D. (2002). Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol.Microbiol.*, 45, 9-15.
- Morrow, J. D. (2000). The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev.*, 32, 377-385.
- Niswender, K. D., Shiota, M., Postic, C., Cherrington, A. D., & Magnuson, M. A. (1997). Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J.Biol.Chem.*, 272, 22570-22575.
- Noble, M., Smith, J., Power, J., & Mayer-Proschel, M. (2003). Redox state as a central modulator of precursor cell function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 991, 251-271.

O'Doherty, R. M., Lehman, D. L., Telemaque-Potts, S., & Newgard, C. B. (1999). Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes*, *48*, 2022-2027.

Ogihara, T., Hirano, K., Morinobu, T., Kim, H. S., Hiroi, M., Ogihara, H. et al. (1999). Raised concentrations of aldehyde lipid peroxidation products in premature infants with chronic lung disease. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed*, *80*, F21-F25.

Oscai, L. B. & McGarr, J. A. (1978). Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *Am.J.Physiol*, *235*, R141-R144.

Oshita, M., Takehara, H., Yamaguchi, M., Doi, K., Ueda, N., Naito, S. et al. (2004). Significance of administration of fat emulsion: hepatic changes in infant rats receiving total parenteral nutrition with and without fat. *Clin.Nutr.*, *23*, 1060-1068.

Peuchant, E., Brun, J. L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. J., Daniel, J. Y. et al. (2004). Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin.Biochem.*, *37*, 293-298.

Pitkanen, O. M., Hallman, M., & Andersson, S. M. (1990). Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J.Pediatr.*, *116*, 760-764.

Pladys, P., Lahaie, I., Cambonie, G., Thibault, G., Le, N. L., Abran, D. et al. (2004). Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr.Res.*, *55*, 1042-1049.

Ramasethu, J. (2008). Complications of vascular catheters in the neonatal intensive care unit. *Clin.Perinatol.*, *35*, 199-222, x.

Rich-Edwards, J. W., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. et al. (1997). Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*, *315*, 396-400.

Rickett, G. M. & Kelly, F. J. (1990). Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver. *Development*, *108*, 331-336.

Roberts, J. M. & Lain, K. Y. (2002). Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, *23*, 359-372.

Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Ravelli, A. C., Osmond, C., Barker, D. J., & Bleker, O. P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol.Cell Endocrinol.*, 185, 93-98.

Rosenson, R. S. (2004). Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, 173, 1-12.

Salonen, M. K., Kajantie, E., Osmond, C., Forsen, T., Yliharsila, H., Paile-Hyvarinen, M. et al. (2009). Childhood growth and future risk of the metabolic syndrome in normal-weight men and women. *Diabetes Metab*, 35, 143-150.

Salonen, M. K., Kajantie, E., Osmond, C., Forsen, T., Yliharsila, H., Paile-Hyvarinen, M. et al. (2009). Role of childhood growth on the risk of metabolic syndrome in obese men and women. *Diabetes Metab*, 35, 94-100.

Sartorio, A., Lafortuna, C. L., Vangeli, V., Tavani, A., Bosetti, C., & La, V. C. (2001). Short-term changes of cardiovascular risk factors after a non-pharmacological body weight reduction program. *Eur.J.Clin.Nutr.*, 55, 865-869.

Sauberlich, H. E. (1994). Pharmacology of vitamin C. *Annu.Rev.Nutr.*, 14, 371-391.

Saugstad, O. D. (2001). Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.*, 13, 147-153.

Savich, R. D., Finley, S. L., & Ogata, E. S. (1988). Intravenous lipid and amino acids briskly increase plasma glucose concentrations in small premature infants. *Am.J.Perinatol.*, 5, 201-205.

Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic.Biol.Med.*, 30, 1191-1212.

Schmid, E., El, B. J., Galter, D., Klein, G., & Droge, W. (1998). Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB J.*, 12, 863-870.

Schmid, E., Hotz-Wagenblatt, A., Hacj, V., & Droge, W. (1999). Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide: the structural basis of redox priming. *FASEB J.*, 13, 1491-1500.



Schwarz, J. M., Neese, R. A., Turner, S., Dare, D., & Hellerstein, M. K. (1995). Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection. *J.Clin.Invest*, 96, 2735-2743.

Sherlock, R. & Chessex, P. (2009). Shielding parenteral nutrition from light: does the available evidence support a randomized, controlled trial? *Pediatrics*, 123, 1529-1533.

Simmons, R. (2005). Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol.Metab*, 16, 390-394.

Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., & Lucas, A. (2004). Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. *Lancet*, 363, 1571-1578.

Singhal, A., Cole, T. J., & Lucas, A. (2001). Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet*, 357, 413-419.

Singhal, A., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S., Cole, T. J., Fewtrell, M., & Lucas, A. (2002). Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am.J.Clin.Nutr.*, 75, 993-999.

Singhal, A., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S., Cole, T. J., Fewtrell, M., & Lucas, A. (2002). Early nutrition and leptin concentrations in later life. *Am.J.Clin.Nutr.*, 75, 993-999.

Singhal, A., Fewtrell, M., Cole, T. J., & Lucas, A. (2003). Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet*, 361, 1089-1097.

Singhal, A., Fewtrell, M., Cole, T. J., & Lucas, A. (2003). Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet*, 361, 1089-1097.

Singhal, A. & Lucas, A. (2004). Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet*, 363, 1642-1645.

Smith, J., Ladi, E., Mayer-Proschel, M., & Noble, M. (2000). Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 10032-10037.

Spadling, D. A (1873). Instinct with original observation on young animals. *Journal of animal behavior*, 2, 2-11.

Stein, C. E., Fall, C. H., Kumaran, K., Osmond, C., Cox, V., & Barker, D. J. (1996). Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet*, 348, 1269-1273.

Terrill, L. A. & Clemons, D. J. (1998). Anatomic and physiologic features. In M.A.Suckow (Ed.), *The Laboratory Guinea Pig* (CRC press ed., pp. 23-27).

Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem.Cell Biol.*, 122, 339-352.

Turcot, V., Rouleau, T., Tsopmo, A., Germain, N., Potvin, L., Nuyt, A. M. et al. (2009). Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic.Biol.Med.*, 47, 275-282.

Turley, S. D., West, C. E., & Horton, B. J. (1976). The role of ascorbic acid in the regulation of cholesterol metabolism and in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, 24, 1-18.

Urtasun, R., Conde, d. I. R., & Nieto, N. (2008). Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin.Liver Dis.*, 12, 769-90, viii.

Valdez, R., Athens, M. A., Thompson, G. H., Bradshaw, B. S., & Stern, M. P. (1994). Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia*, 37, 624-631.

Vento, M., Asensi, M., Sastre, J., Lloret, A., Garcia-Sala, F., & Vina, J. (2003). Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J.Pediatr.*, 142, 240-246.

Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., & Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 279, E83-E87.

Vickers, M. H., Breier, B. H., McCarthy, D., & Gluckman, P. D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 285, R271-R273.

Vila, M., Ruiz, O., Belmonte, M., Riesco, M., Barcelo, A., Perez, G. et al. (2009). Changes in lipid profile and insulin resistance in obese patients after Scopinaro biliopancreatic diversion. *Obes.Surg.*, 19, 299-306.

Vileisis, R. A., Cowett, R. M., & Oh, W. (1982). Glycemic response to lipid infusion in the premature neonate. *J.Pediatr.*, 100, 108-112.

Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R. et al. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat.Neurosci.*, 7, 847-854.

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

Wu, J., Hong, L., Cai, W., Tang, Q., & Shi, C. (2007). Glutamine attenuates TPN-associated liver injury in infant rabbits. *Eur.J.Pediatr.*, 166, 601-606.

Yeung, C. Y., Lee, H. C., Huang, F. Y., & Wang, C. S. (1998). Sepsis during total parenteral nutrition: exploration of risk factors and determination of the effectiveness of peripherally inserted central venous catheters. *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 17, 135-142.