



Université de Montréal

**La contamination de la nutrition parentérale par  
l'ascorbylperoxyde perturbe le métabolisme énergétique  
chez le cochon d'inde nouveau-né**

par

Maghdessian Raffi

Département de Nutrition

Faculté de médecine

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

Janvier, 2010

© Maghdessian Raffi, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La contamination de la nutrition parentérale par  
l'ascorbylperoxyde perturbe le métabolisme énergétique  
chez le cochon d'inde nouveau-né**

présenté par :  
Maghdessian Raffi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Geneviève Mailhot, président-rapporteur  
Jean-Claude Lavoie, directeur de recherche  
Mounib Elchebly, membre du jury

## Résumé

**Introduction** : L'exposition à la lumière des solutions de nutrition parentérale (NP) génère des peroxydes tels que l' $H_2O_2$  et l'ascorbylperoxyde (AscOOH). Cette absence de photoprotection provoque une augmentation des triglycérides (TG) plasmatique chez les enfants prématurés et chez un modèle animal, ayant un stress oxydatif et une stéatose hépatique indépendante de l'exposition au  $H_2O_2$ . Nous pensons que l'AscOOH est l'agent actif conduisant à l'élévation des TG. Le but est d'investiguer le rôle de l'AscOOH sur les métabolismes du glucose et des lipides à l'aide d'un modèle animal néonatal de NP.

**Méthodes** : Des cochons-d'inde de trois jours de vie (n=21) recevaient, via un cathéter jugulaire, une solution contenant du dextrose + 0, 90, 225 ou 450  $\mu M$  d'AscOOH. Après quatre jours, le sang et le foie étaient prélevés et traités en vue de déterminer les TG, le cholestérol, des marqueurs de stress oxydant (potentiel redox du glutathion,  $F_{2\alpha}$ -isoprostane), ainsi que l'activité de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et l'hexokinase (HK). Par ailleurs, en plus de leur activité, le niveau de protéine de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), de la glucokinase (GK) et de la phosphofructokinase (PFK) a été mesuré. La concentration urinaire d'AscOOH était déterminée le dernier jour. Les données étaient comparées par ANOVA,  $p < 0.05$

**Résultats** : Les TG et le cholestérol plasmatique ainsi que l'activité hépatique de la PFK augmentaient (200% comparé aux témoins), alors que l'ACC diminuait (66% comparé aux contrôles), en fonction de la quantité d'AscOOH infusé. Aucune différence d'activité entre les groupes concernant la GK, l'HK, l'AMPK. Les deux marqueurs de stress oxydatif étaient augmentés chez les animaux recevant le plus d'AscOOH. La relation logarithmique entre la concentration urinaire d'AscOOH et les TG plasmatiques ( $r^2=0.69$ ) et l'activité hépatique de la PFK ( $r^2=0.26$ ) était positive, tandis qu'elle était négative pour l'activité de l'ACC ( $r^2=0.50$ ).

**Conclusion** : l'AscOOH contaminant la NP stimule la glycolyse permettant une plus grande disponibilité de substrat pour la lipogenèse. La relation logarithmique entre l'AscOOH urinaire et les TG plasmatiques suggère une efficacité dès les plus basses concentrations.

**Mots-clés** : Acétyl-CoA carboxylase, ascorbylperoxyde, glycolyse, lipogenèse, stress oxydatif, nutrition parentérale, phosphofructokinase, triacylglycérol, vitamine C.

## Abstract

**Introduction:** The light exposure of parenteral nutritive solutions generates peroxides such as  $H_2O_2$  and ascorbylperoxide. This absence of photo-protection is associated with higher plasma triacylglycerol concentration (TG) in premature infants and, in animals, with oxidative stress and a  $H_2O_2$  independent hepatic steatosis. We hypothesized that ascorbylperoxide is the active agent leading to high TG. The aim was to investigate the role of ascorbylperoxide on glucose and lipid metabolism in an animal model of neonatal parenteral nutrition.

**Method:** Three day-old guinea pigs (n=21) received, through a catheter in jugular, solutions containing dextrose + 0, 90, 225 or 450  $\mu M$  ascorbylperoxide. After 4 days, blood and liver were sampled and treated for determinations of TG, cholesterol, markers of oxidative stress (redox potential of glutathione &  $F_{2\alpha}$ -isoprostane) and to measure the activities of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) and hexokinase (HK). We also determined the activities & protein levels of acetylCoA carboxylase (ACC), glucokinase (GK), and phosphofructokinase (PFK). Ascorbylperoxide concentration was measured in urine of the last day. Data were compared by ANOVA,  $p < 0.05$ .

**Results:** Plasma TG and cholesterol as well as hepatic PFK activity increased (200% of control), whereas ACC activity decreased (66% of control), in function of amount of ascorbylperoxide infused. There was no difference between groups for GK, HK and AMPK's activity. Both markers of oxidative stress were higher in animals receiving the highest ascorbylperoxide. The logarithmic relations between urinary ascorbylperoxide and plasma TG ( $r^2=0.69$ ) and hepatic PFK activity ( $r^2=0.26$ ) were positive, whereas it was negative with ACC activity ( $r^2=0.50$ ).

**Conclusion:** The ascorbylperoxide contaminating the parenteral nutrition stimulates glycolysis allowing higher availability of substrates for lipid synthesis. The logarithmic relation between urinary ascorbylperoxide and plasma TG suggests a very low efficient concentration.

**Keywords :** acetylCoA carboxylase, ascorbylperoxide, glycolysis, lipogenesis, oxidative stress, parenteral nutrition, phosphofructokinase, triacylglycerol, vitamin C.

Table des matières	
Page de présentation.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Liste des abréviations .....	viii
Liste des figures.....	x
Remerciements .....	xii
1. Introduction.....	1
2. Le prématuré .....	2
2.1.1. Spécificité .....	2
2.1.2. Besoins nutritionnels .....	2
2.1.3. Rôle du support nutritionnel en néonatalogie.....	3
2.2. La nutrition parentérale.....	4
2.2.1. Les complications de la nutrition parentérale.....	5
2.2.2. Stabilité chimique de la nutrition parentérale.....	5
2.2.3. La photo-oxydation de l'ascorbate par la riboflavine.....	6
2.2.4. Complications associées à la photo-oxydation de la nutrition parentérale.....	8
2.2.5. Conséquence d'une nutrition parentérale photo-oxydée sur la défense antioxydante.....	9
2.3. Le métabolisme énergétique hépatique .....	11
2.3.1. Aperçu du métabolisme lipidique hépatique.....	13
2.3.2. Les enzymes clés de la glycolyse cytoplasmique.....	14
2.3.3. Répercussions chez le nouveau-né d'une perturbation du métabolisme énergétique hépatique.....	16
3. Hypothèse et objectif de l'étude.....	18
4. Méthodologie .....	20
4.1. Préliminaire de l'étude .....	20
4.2. Méthodes présentées dans l'article.....	21

4.3.	Détails des méthodes abrégées de l'article.....	23
4.3.1.	Acétyl-CoA carboxylase.....	23
4.3.1.1.	Activité enzymatique de l'acétyl-CoA carboxylase.....	23
4.3.1.2.	Immuno-buvardage de l'acétyl-CoA carboxylase.....	24
4.3.2.	Phosphofructokinase.....	25
4.3.2.1.	Activité enzymatique de la phosphofructokinase.....	25
4.3.2.2.	Immuno-buvardage de la phosphofructokinase.....	25
4.3.3.	Glucokinase.....	26
4.3.3.1.	Activité enzymatique de la glucokinase.....	26
4.3.3.2.	Immuno-buvardage de la glucokinase.....	27
4.3.4.	GSH et GSSG.....	27
4.3.5.	Triglycérides et cholestérol (plasmatiques et hépatiques).....	28
4.3.6.	Isoprostane.....	29
4.4.	Autres méthodes non insérées dans l'article.....	30
4.4.1.	Protéine Kinase Activée par l'AMP.....	30
4.4.1.1.	Activité enzymatique de l'AMPK.....	30
5.	Article soumis au journal scientifique The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.....	32
6.	Autres résultats.....	58
6.1.	Activité enzymatique de l'hexokinase.....	58
6.2.	Activité enzymatique de l'AMPK.....	59
7.	Discussion.....	63
8.	Conclusion.....	69
	Bibliographie.....	I

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b>	Synthèse des différentes recommandations nutritionnelles.....	3
------------------	---	---



## Liste des abréviations

<b>ACC</b>	acétyl-coA carboxylase
<b>Acétyl-CoA</b>	acétyl-coenzyme A
<b>Acyl-CoA</b>	acyl-coenzyme A
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AGL</b>	acide gras libre
<b>AMP</b>	adénosine monophosphate
<b>AMPK</b>	protéine kinase activée par l'AMP
<b>ANOVA</b>	analyse de variance
<b>AscOOH</b>	ascorbylperoxyde
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>ChREBP</b>	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
<b>°C</b>	degré celsius
<b>ERO</b>	espèce réactive à l'oxygène
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	fer ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	fer ferrique
<b>(x) g</b>	force gravitationnelle
<b>g</b>	gramme
<b>GK</b>	glucokinase
<b>GLUT</b>	<i>Glucose Transporter</i> , transporteur de glucose
<b>GSH</b>	glutathion réduit
<b>GSSG</b>	forme disulfure du glutathion
<b>HMGR</b>	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase
<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>Kcal</b>	kilocalorie
<b>Kg</b>	kilogramme
<b>K<sub>m</sub></b>	constante de Michaelis

<b>L</b>	litre
<b>Malonyl-Coa</b>	malonyl-coenzyme A
<b>m</b>	milli
<b>μ</b>	micro
<b>M</b>	molaire (millimole/litre)
<b>min</b>	minute
<b>MV</b>	multivitamine
<b>NADPH/NADP<sup>+</sup></b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée
<b>NO</b>	monoxyde d'azote
<b>NP</b>	nutrition parentérale
<b>O<sub>2</sub></b>	oxygène
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	superoxyde
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxygène singulet
<b>OH<sup>·</sup></b>	radical hydroxyle
<b>ONOOH</b>	acide péroxynitreux
<b>p</b>	pico
<b>PBST</b>	phosphate buffered saline Tween-20
<b>PFK</b>	phosphofructokinase
<b>pH</b>	potentiel hydrogène
<b>PP2A</b>	protéine phosphatase de type 2A
<b>ROO<sup>·</sup></b>	radical peroxyde
<b>SA</b>	semaine d'aménorrhée
<b>s.e.m.</b>	erreur type à la moyenne
<b>-SH</b>	fonction sulfhydryle
<b>SREBP-1</b>	<i>sterol regulatory element binding protein-1</i>
<b>TG</b>	triglycéride

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Schéma simplifié de la formation de l'ascorbylperoxyde.....	7
<b>Figure 2</b>	Aperçu des mécanismes de défense endogène.....	11
<b>Figure 3</b>	Résumé du métabolisme énergétique hépatique.....	12
<b>Figure 4</b>	Schéma résumant la glycolyse et ses dix réactions.....	15
<b>Figure 5</b>	Activité de l'hexokinase hépatique en fonction de l'AscOOH infusé.....	58
<b>Figure 6</b>	Activité basale de l'AMPK en fonction de l'AscOOH infusé.....	60
<b>Figure 7</b>	Activité de l'AMPK activée en fonction de l'AscOOH infusé.....	60
<b>Figure 8</b>	Rapport de l'activité de l'AMPK basale sur l'AMPK activée en fonction de l'AscOOH perfusé.....	61
<b>Figure 9</b>	Relation entre l'activité de l'AMPK basale et l'activité de la PFK hépatique.....	62
<b>Figure 10</b>	Résumé sommaire des effets de l'AscOOH sur lipogenèse.....	65

*Un immense merci et une pensée à tous ceux qui m'ont soutenu dans ce projet. Ma première pensée va à mon épouse qui a été ma grande complice et le valeureux témoin de tous mes états d'âme.*

## Remerciements

Un grand merci d'abord à mon employeur, sans qui rien de tout cela ne serait possible. Un coup de chapeau à toute l'équipe du laboratoire, c'est-à-dire à mon directeur, le Dr. Jean-Claude Lavoie, à Thérèse Rouleau et Khalil Miloudi qui avec une patience et une ferveur sans faille m'ont initié à la recherche et aux subtilités de la biochimie. J'espère avoir été un étudiant à la hauteur de la passion que Jean-Claude et Thérèse ont pour leur métier. J'ai reçu de leur part, moi qui connaissais peu de choses de la biochimie, un enseignement de qualité, qui m'a permis d'acquérir de solides connaissances dans ce domaine intimement lié à la nutrition.

Un grand merci à ma famille pour l'appui logistique, moral et parfois financier.

Merci également aux membres du jury, pour le temps qu'ils vont consacrer à lire et à évaluer la qualité de mon mémoire.

Enfin merci à toute l'équipe du Dr. Levy pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour ses nombreux dépannages.

# 1. Introduction

La nutrition parentérale (NP) en néonatalogie a beaucoup évolué ces 30 dernières années. C'est un support indispensable à la prise en charge des prématurés dont le tube digestif n'est pas encore fonctionnel et qui ne survivraient pas sans cette assistance nutritionnelle [1-3]. Malgré tout, la NP reste perfectible, et plusieurs études soulignent les effets secondaires de cette thérapeutique [4, 5]. Un aspect en particulier nous intéresse, c'est celui qui concerne la photo-exposition de la NP par la lumière. Ce phénomène induit la production de nombreuses molécules, dont certaines agressent le prématuré [6-14]. Ces molécules semblent même capables de moduler, à travers des phénomènes épigénétiques, l'expression du génome [15].

L'ascorbylperoxyde (AscOOH) étudié dans ce manuscrit fait partie de cette classe de molécule provenant d'une exposition à la lumière des poches et des tubulures de nutrition. C'est une molécule potentiellement oxydante de part son caractère peroxydé, et qui semble agir sur le métabolisme énergétique hépatique. Elle fait ainsi partie des molécules suspectées d'avoir un effet délétère sur la santé des prématurés.

La découverte de cette molécule par l'équipe du Dr. Lavoie fait suite à une série de travaux entamés il y a une dizaine d'années [16].

Le nombre de nouveau-nés prématurés aux États-Unis représente 500'000 enfants par an [17, 18], globalement ce chiffre varie dans les pays industrialisés entre 5% et 12% des naissances et semble en augmentation depuis les années 1980 [19]. Bien que seuls les grands prématurés nécessitent systématiquement une NP, les chiffres ci-dessus indiquent qu'un grand nombre d'enfants dans le monde est potentiellement concerné par la toxicité de l'AscOOH infusé à travers la NP.

Cette molécule mérite donc toute notre attention, afin d'optimiser le support nutritionnel des grands prématurés et ne pas exposer ces enfants à un fardeau supplémentaire.

Afin de mieux cerner la problématique soulevée par l'AscOOH, nous allons passer en revue dans les chapitres à venir : le prématuré, la nutrition parentérale, le métabolisme énergétique hépatique, en particulier la glycolyse et la lipogénèse.

## 2. Le prématuré

Les critères de l'OMS classifient un enfant comme prématuré s'il est né avant le terme des 37 semaines d'aménorrhée révolues (SA), environ 8 mois de grossesse. A l'heure actuelle, la limite de viabilité pour un prématuré est autour de 22 SA, pour un poids minimum de 500g. Il existe différentes catégories de prématurité :

- Prématurité : 32 à 37 SA
- Grande prématurité : 27 à 32 SA
- Très grande prématurité : 25 à 27 SA
- Extrême prématurité : 22 à 25 SA

L'accroissement des naissances avant terme semble être principalement dû à l'augmentation des gestations multipares liées aux techniques de fécondation *in vitro*. Les naissances prématurées sont responsables de 75 % des décès périnataux et de 50 % de la morbidité à long terme. Bien que la majorité des prématurés survivent, ils sont à haut risque de complications neuro-développementales, digestives et respiratoires [19].

### 2.1.1. Spécificité

Un prématuré naît avec de faibles réserves énergétiques et un tube digestif souvent immature. Ce n'est que vers la 34<sup>ème</sup> semaine que ces enfants sont capables de coordonner la succion, la déglutition avec leur respiration afin d'être nourri *per os* [20]. De plus ils sont vulnérables aux molécules oxydantes, car leur système de défense est immature [21]. Ces enfants subissent facilement des stress physiologiques et métaboliques, car nombreux sont ceux qui souffrent d'infections ou de détresse respiratoire [20].

### 2.1.2. Besoins nutritionnels

La couverture des besoins nutritionnels des prématurés ne fait pas l'objet de consensus. En effet, il existe différentes tendances allant de l'introduction macronutriment par macronutriment sur une période de plusieurs jours à une nutrition plus agressive prônant l'introduction dès la naissance d'un support intraveineux complet à un débit couvrant les

besoins nutritionnels du prématuré. En nutrition clinique, et particulièrement en néonatalogie, il existe un manque cruel d'évidences scientifiques permettant d'élaborer des recommandations.

**Tableau I** : Synthèse de différentes recommandations [20, 22, 23] provenant d'Europe et d'Amérique du Nord.

<b>Apports énergétique</b>	100-120 kcal/kg/jour
<b>Protéines</b>	4 g/kg/jour (24-25 semaines), 3.5-3.7 g/kg/jour (27-28 semaines), 3.3 g/kg/jour (30-32 semaines)
<b>lipides</b>	4.5-6.8 g/kg/jour (25 à 40% de l'apport énergétique non protéique)
<b>Glucides</b>	6-12 g/kg/j
<b>Apports hydrique</b>	150 ml/kg/jour

L'on remarque que les apports en protéines varient sensiblement en fonction de la prématurité, plus les enfants sont prématurés et plus les apports protéiques recommandés sont élevés. D'une manière globale les besoins énergétiques des prématurés sont importants, car les apports requis (Kcal/kg/jour) sont environ 4 à 5 fois ceux d'un adulte. Sur le plan quantitatif, une augmentation de 20g/kg/j est considérée comme satisfaisante, car elle permet d'amorcer une croissance de rattrapage, sachant que la croissance du fœtus du même âge ( $\leq 32$  semaines) est de 15g/kg/j [24].

### 2.1.3. Rôle du support nutritionnel en néonatalogie

Le support nutritionnel a comme première fonction, la couverture des besoins en macro et micronutriments afin de permettre un développement optimal de l'enfant. Le corps d'un prématuré de 1kg ne contient à la naissance que 1% de masse grasse et 8% de masse protéique et ses réserves énergétiques non-protéiques sont de seulement 110 kcal par kilogrammes de masse corporelle [23]. Chez les prématurés, la croissance du cerveau est au cœur des préoccupations car les séquelles à long terme ne sont pas rares et peuvent être



lourdes de conséquences [22]. Le déficit de croissance post-natal, qui est la morbidité la plus fréquente, est expliquée à 50 % par des déficits calorique et protéiques [25]. Ces données nous montrent qu'il est important d'agir vite chez ces enfants qui présentent, proportionnellement au nombre de semaines de gestation, des risques importants de carences nutritionnelles invalidantes.

Une autre particularité du support nutritionnel en néonatalogie est la mise en place d'une nutrition entérale à faible débit dès les premiers jours de vie, en parallèle à la nutrition parentérale. Cette nutrition orale prévient l'atrophie intestinale, stimule la croissance du système gastro-intestinal et diminue le risque d'entérocolite nécrosante lorsque l'on utilise du colostrum ou du lait humain. De plus, stimuler précocement le tube digestif semble accélérer et améliorer la tolérance alimentaire chez ces enfants [22].

## **2.2. La nutrition parentérale**

La nutrition parentérale est utilisée les 2 à 3 premières semaines de vie chez les prématurés [26] et, contrairement à ce qui se passe chez l'adulte, en néonatalogie elle est faite sur mesure pour chaque enfant. La NP est composée d'acides aminés, de lipides et d'hydrates de carbone sous forme de glucose, mais également d'oligo-éléments et d'un complexe multivitaminique. La NP pédiatrique est administrée de deux manières soit dans un "2 en 1" ou dans un "3 en 1". Le 2 en 1 consiste à mélanger tous les composants dans une poche à l'exception des lipides, alors que dans le 3 en 1 tous les composants sont mélangés dans la même poche. Séparer les lipides des autres constituants confère une plus grande stabilité physico-chimique à l'émulsion lipidique [23, 27] et diminue la production de lipoperoxydes toxiques pour le nouveau-né [28, 29]. Il est surprenant de constater que l'on ne fait rien en revanche concernant la lumière malgré une accumulation de preuves montrant son effet sur la génération de peroxydes dans les solutions de NP [13, 16, 30-33].

Les poches utilisées sont faites à base d'acétate d'éthylvinyle et la NP est perfusée en continu via une voie veineuse centrale (longue durée) ou périphérique (courte durée). En plus de devoir être préparée dans un milieu aseptique, en suivant des procédures très strictes, la nutrition intraveineuse est instable et très réactive d'un point de vue chimique, ce

qui nécessite beaucoup de précautions dans sa réalisation en pharmacie et lors de sa perfusion dans les unités.

Alors qu'encore récemment 24 à 48 heures s'écoulait avant l'introduction de la NP, il est actuellement recommandé d'apporter au moins 1g/kg par jour de protéines dès le premier jour de vie, car les enfants sont en catabolisme à la naissance. Une équipe suggère même l'apport dès la naissance de 3g/kg/j [34]. Techniquement, il est souvent difficile de mettre rapidement en place une NP couvrant les besoins calorico-protéiques, surtout chez les grands prématurés ( $\leq 28$  SA), car ils souffrent d'une intolérance au glucose, nécessitant une perfusion d'insuline à débit constant afin de maintenir la glycémie dans des normes acceptables [24].

### **2.2.1. Les complications de la nutrition parentérale.**

Elles peuvent être très sérieuses. Elles proviennent soit du cathéter soit d'un désordre métabolique. Celles provenant du cathéter sont les bactériémies, les thromboses, l'extravasation (si NP en voie périphérique), la tamponnade cardiaque et l'infection fongique. Celles métaboliques sont la cholestase, l'hyperglycémie (avec ou sans glycosurie), l'hypo ou l'hypervitaminose et l'hyperammoniémie et la dysplasie broncho-pulmonaire. La complication sévère la plus fréquente est l'infection sanguine suite à une contamination du cathéter [20].

### **2.2.2. Stabilité chimique de la nutrition parentérale.**

Comme dit précédemment, la NP est composée de macro et de micronutriments, à des doses physiologiques supposées être suffisantes pour couvrir les besoins du patient. Ces dernières années avec l'évolution des connaissances en nutrition, de nouveaux éléments traces ont fait leur apparition dans les recommandations, tels que le sélénium, molybdène, chrome ou le brome, dont les besoins journaliers sont encore mal connus à ce jour. Ces nouveaux éléments contribuent à rendre plus complexe encore les solutions de nutrition intraveineuses. Avec plus de cent espèces chimiques présentes dans la NP, il existe donc un énorme potentiel d'interactions [23]. L'adjonction de micronutriments (électrolytes,

éléments traces, vitamines) peuvent conduire à des précipitations causées par une incompatibilité physique conduisant à une dégradation chimique des constituants de la NP [27].

Globalement les facteurs influençant la stabilité des solutions de NP sont le type de poche utilisé (multicouches ou pas), le pH, la température, la lumière, la composition en acides aminés, la concentration en magnésium, en phosphate et le type de sel de calcium (organique ou pas) [23, 27, 35].

La précipitation phosphocalcique est le risque majeur relatif à l'adjonction d'éléments traces ou d'électrolytes dans la NP. C'est néanmoins un risque bien connu qui ne devrait plus poser de problème aujourd'hui. La stabilité des solutions lipidiques est un autre point important, car si l'émulsion est déstabilisée par l'adjonction de cations et que les glomérules lipidiques grossissent en s'assemblant, passé un diamètre de 5 $\mu$ m, il y a un sérieux risque d'embolie pulmonaire [36]. Bien que les données diffèrent concernant l'oxydation des vitamines, principalement à cause des protocoles et du matériel utilisé dans les études, il ne fait aucun doute que les vitamines sont les éléments les plus instables de la NP et que leur teneur décroît rapidement et de façon significative. Par exemple la teneur en vitamine C décroît de 10 à 30 % dans les minutes qui suivent son adjonction à la NP à cause de son oxydation catalysée par des ions métalliques [37]. Globalement un rapide phénomène d'oxydation de certaines vitamines s'observe dans les poches de nutrition, conduisant à la production de peroxydes, que les poches soient exposées ou non à la lumière [16, 32, 38].

### **2.2.3. La photo-oxydation de l'ascorbate par la riboflavine.**

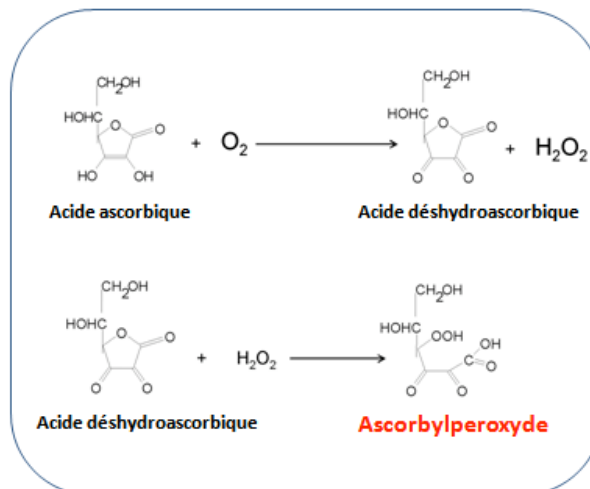
La vitamine C est un important élément de la défense anti-oxydante mais dans certaines conditions spécifiques, elle peut avoir un effet pro-oxydant [39]. Ses propriétés anti-oxydantes résident dans sa capacité à donner deux atomes d'hydrogènes afin de neutraliser les molécules oxydantes, cette étape est suivie d'une transformation réversible en déshydroascorbate [40]. Lors des étapes intermédiaires de ce processus, des radicaux de la vitamine C (sémi-déshydroascorbate) se forment et peuvent interagir avec les ions ferreux pour former du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dans certaines conditions, ce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé

peut conduire à la formation de radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) et ainsi provoquer des dommages aux tissus [41].

Dans les poches de NP exposée à la lumière, c'est la riboflavine, une vitamine hydrosoluble du groupe des vitamines B, qui une fois photo-excitée catalyse le transfert d'électrons entre l'acide ascorbique et l'oxygène dissout [42, 43]. Ce processus explique en partie la formation constatée de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lors de l'adjonction de multivitamines (MV) dans les poches de nutrition [16, 32, 44]. Il a été démontré précédemment que 15 à 20 % des peroxydes formés sont résistants à la catalase, ce qui signifie que ce sont des peroxydes organiques [16] alors que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est lui inorganique. C'est cette fraction de 15 à 20 % de peroxydes qui nous intéresse dans ce mémoire, car il semble qu'elle ait des effets métaboliques qui lui sont propres et qui soient différents de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  [9]. Suite au travail de Knafo en 2005 [45], nous savons que cette molécule, qui est un dérivé peroxydé de l'acide ascorbique, a une masse moléculaire de 208g/mol. Dans ce même travail, il a été démontré que cette molécule, lorsqu'elle était perfusée chez un modèle animal néonatal, activait l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et semblait ainsi pouvoir influencer la lipogenèse hépatique.

Nous avons nommé par commodité cette molécule Ascorbylperoxyde ( $\text{AscOOH}$ ), mais c'est un raccourci, car son appellation chimique complète est : acide 2,3-dicéto-4-hydroperoxyl-5,6-dihydroxyhexanoïque.

Figure 1: Schéma simplifié de la formation de l'ascorbylperoxyde :



Légende :  $\text{O}_2$  : oxygène;  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène

#### **2.2.4. Complications associées à la photo-oxydation de la nutrition parentérale**

L'équipe du Dr. Lavoie se penche sur la question de la photo-oxydation des solutions de NP et son impact sur la santé des prématurés depuis 1997 [16]. Il est maintenant reconnu que la NP exposée à la lumière est associée à une perte de vitamines anti-oxydantes, à la génération de peroxydes et de sous-produits de la peroxydation lipidique [6], tout ceci crée un environnement néfaste pour le prématuré. En effet plusieurs études ont démontré, sur des modèles animaux et humains, que la NP exposée à la lumière était impliquée dans le développement de plusieurs pathologies [6, 9, 46-48].

Il ne faut pas oublier que la charge oxydante que reçoivent les nouveau-nés via la NP sans photo-protection, s'ajoute à celle provenant de l'oxygénothérapie. Chez le prématuré la défense anti-oxydante étant faible [49], on imagine facilement les dégâts que cela peut causer.

Au niveau pulmonaire, la perfusion de solution de NP exposée à la lumière est reliée à une augmentation de l'incidence de la dysplasie broncho-pulmonaire autant chez un modèle animal que chez l'humain [8, 10, 47, 48, 50]. Cette complication qui se caractérise par une diminution du nombre d'alvéoles pulmonaires et par un début de fibrose est une pathologie chronique entraînant une augmentation des ré-hospitalisations, un accroissement des décès durant l'enfance, des retards de croissance, des rétinopathies [51] et des atteintes neurocomportementales qui constituent un fardeau à vie.

Au niveau hépatique, la photo-oxydation de la nutrition intraveineuse induit une stéatose chez le cochon d'inde nouveau-né. Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore élucidé mais il semble qu'un composant des MV devienne hépatotoxique lors de son exposition à la lumière car en retirant la riboflavine des solutions, l'effet lumière disparaît [9].

Comme cité précédemment, nous suspectons, depuis les travaux de Knafo en 2005, qu'un ou plusieurs constituants des poches de NP exposées à la lumière modulent le métabolisme hépatique en perturbant la glycémie et la lipogénèse. Une étude canadienne de 2009 montre l'effet de la lumière sur ces deux paramètres et son impact dans la prise en charge des prématurés dans une unité de néonatalogie [46]. En effet l'hypertriglycéridémie entrave la

mise en place optimale du support nutritionnel qui doit être diminué en fonction de la dyslipidémie. Ceci empêche l'équipe médicale de soutenir efficacement les enfants dans cette phase cruciale de leur développement.

### **2.2.5. Conséquence d'une nutrition parentérale photo-oxydée sur la défense antioxydante.**

Nous venons de voir que l'oxydation de la NP a plusieurs répercussions physiopathologiques. Je voudrais revenir sur une en particulier, celle qui concerne la défense anti-oxydante. En effet, un stress oxydant modulant le potentiel redox intracellulaire est probablement un point clé des effets constatés de l'AscOOH.

Pour définir le stress oxydant, il faut d'abord définir ce qu'est un radical libre. C'est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui donne une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. La réactivité du radical libre varie en fonction de sa nature. Parmi les plus communs chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) et le NO sont relativement peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaînes qui formeront des radicaux libres beaucoup plus réactifs. A titre d'exemple l' $O_2^{\bullet -}$  est le contributeur majeur *in vivo* à la formation de  $H_2O_2$ . Les radicaux peroxydes ( $ROO^{\bullet}$ ) et hydroxyles ( $OH^{\bullet}$ ) sont très réactifs et proviennent respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et de la scission de l' $H_2O_2$  par la réaction de Fenton ( $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$ ). D'autres espèces dérivées de l'oxygène existent comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et l'acide peroxy-nitrique (ONOOH), et bien qu'ils ne soient pas des radicaux libres au sens propre du terme, ils sont très réactifs et peuvent conduire à l'oxydation de molécules [52, 53].

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent d'un gain d'électron à partir de l' $O_2$ , les espèces réactives à l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes, ROOH et  $H_2O_2$ ). Une des particularités de l' $H_2O_2$  est qu'en plus d'être assez stable il a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques, contrairement aux autres dérivés radicalaires. L'oxygène a un rôle paradoxal, il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais il est en même temps une source d'ERO. Ces derniers agressent et oxydent des macromolécules

telles que l'ADN, les protéines et les lipides. Cependant il semble que les ERO soient aussi des produits essentiels au fonctionnement cellulaire, car ils sont impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et agiraient comme second messager intracellulaire [52, 53].

Dans la cellule, il existe une homéostasie entre la production d'ERO et leur neutralisation. Classiquement, un stress oxydant est défini comme un déséquilibre en faveur des ERO qui conduit donc à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels [54].

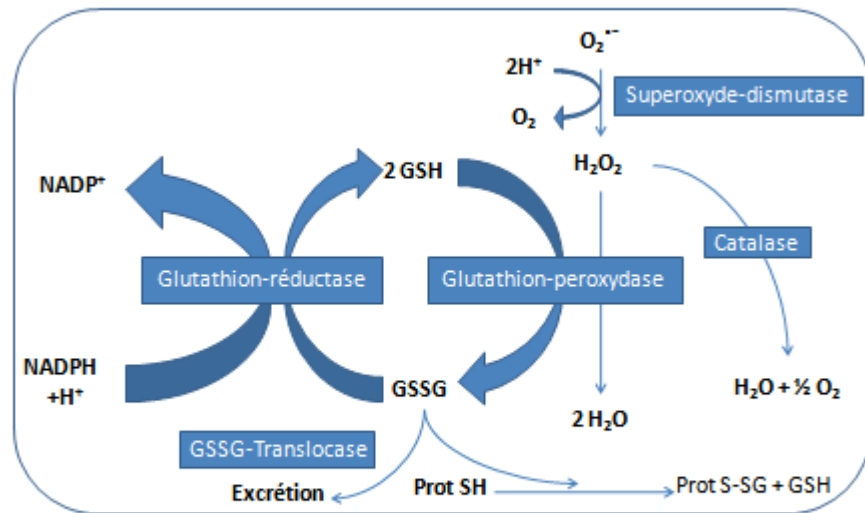
Il existe deux systèmes de défenses contre le stress oxydant : une première ligne de défense est composée d'enzymes spécifiques dont la plupart nécessitent la présence de co-facteurs métalliques pour exercer leur action catalytique telles que les superoxydes dismutases (cuivre et zinc ou manganèse), la catalase, les glutathions peroxydases (sélénium). Une seconde ligne de défense cytosolique et membranaire comprend des anti-radicalaires mis à contribution lorsque les systèmes de défenses enzymatiques sont débordés. Il s'agit des vitamines A, E, C, de molécules anti-oxydantes de petite taille comme le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et enfin d'oligo-éléments tels que le zinc et le sélénium [54, 55].

Il apparaît donc clairement que l'équilibre entre les ERO et les systèmes de défense sont tributaires des apports nutritionnels de vitamines, de micronutriments et d'acides aminés.

Je disais plus haut que la modulation du potentiel redox pourrait être un élément essentiel dans les effets constatés de l'AscOOH sur la glycolyse hépatique. De par sa nature peroxydée nous supposons que cette molécule affecte le potentiel redox intra-cellulaire, ce qui pourrait conduire à une modification de la conformation de la phosphofructokinase (PFK), ce qui affecterait au final son fonctionnement.

Le glutathion réduit (GSH) participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaire grâce à sa fonction sulfhydryle (-SH) à l'origine d'une grande réactivité et d'un puissant pouvoir réducteur. Le rapport tissulaire du GSH / GSSG (glutathion réduit sur disulfure de glutathion) est considéré comme un reflet direct du stress oxydatif [56]. C'est pourquoi nous avons choisi de doser le glutathion (GSH+GSSG) dans différents tissus afin d'évaluer le degré d'agression oxydative.

Figure 2 : Aperçu des mécanismes de défense endogène :



Légende : GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion disulfure;  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène;  $O_2^{\cdot -}$  : anion superoxyde;  $NADP^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée;  $NADPH + H^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite;  $H_2O$  : eau;  $O_2$  : oxygène;  $H^+$  : proton; Prot SH : protéines contenant du soufre.

### 2.3. Le métabolisme énergétique hépatique

Le foie est l'organe central de régulation du métabolisme énergétique. D'une manière générale, le métabolisme a deux tâches principales, la production d'énergie nécessaire aux fonctions vitales et la synthèse de macromolécules.

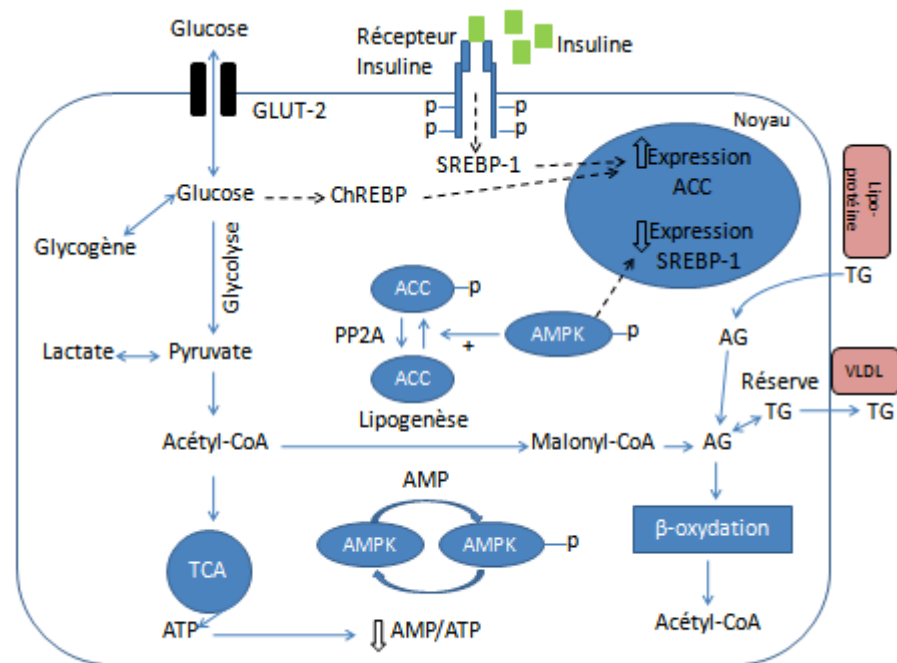
Le métabolisme, hépatique ou non, est constitué de deux phases généralement hormono-médiées : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme dégrade et oxyde les nutriments apportés par l'alimentation ou par les réserves cellulaires. Les réactions cataboliques sont généralement exergoniques et l'énergie libérée est souvent captée sous forme d'ATP. L'anabolisme constitue l'ensemble des séquences métaboliques qui permettent la synthèse de molécules formées à partir de nutriments ou d'intermédiaires métaboliques de structure chimique simple aboutissant à la synthèse de molécules complexes et/ou de macromolécules.

Le foie contrôle la concentration sanguine de la plupart des métabolites, en particulier le glucose et les acides aminés. Cet organe est capable d'absorber de grandes quantités de



glucose, de les stocker sous forme de glycogène et d'en libérer à la demande pour maintenir une glycémie stable. Les excès de glucose sont transformés en glycogène (glycogénogenèse) ou en graisse (lipogenèse). Le foie a aussi comme tâche de synthétiser les principales protéines plasmatiques (telle l'albumine) et de désaminer les acides aminés qui excèdent les besoins, avec formation d'urée qui est transportée au rein via le sang et est excrétée.

Figure 3 : Résumé du métabolisme énergétique hépatique :



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

Chez le nouveau-né, l'interruption de l'apport en glucose maternel à la naissance s'accompagne d'une forte augmentation de sécrétion du glucagon et des catécholamines et d'une chute de l'insuline. Ces modifications hormonales stimulent la production hépatique de glucose, assurée au cours des premières heures par la glycogénolyse, puis par la néoglucogenèse. Elles stimulent aussi la lipolyse qui libère du glycérol, substrat de la

néoglucogénèse et des acides gras libres. Ceux-ci produisent des cofacteurs activateurs de la néoglucogénèse et des corps cétoniques, substrats énergétiques alternatifs pour le cerveau [57]. Paradoxalement, on observe fréquemment des hyperglycémies chez les nouveau-nés de moins de 30 semaines. Elles seraient dues en partie à un défaut de sécrétion de l'insuline et à une résistance partielle à cette hormone.

### **2.3.1. Aperçu du métabolisme lipidique hépatique.**

La régulation du métabolisme lipidique hépatique est principalement déterminée, en plus des nombreuses interactions hormonales, par l'offre en acide gras libre (AGL), ainsi que par l'importance des stocks d'acétyl-CoA mitochondrial. Lorsque l'offre en AGL est élevée (par exemple en situation de jeûne), il existe une activation de la carnitine-palmitoyl-transférase qui permet le transport des acides gras activés (Acyl-CoA) dans les mitochondries. Les conséquences sont une  $\beta$ -oxydation renforcée, une plus grande quantité d'acétyl-CoA et une augmentation de la cétogénèse. Dans le même temps, les AGL inhibent la lipogénèse. En sens inverse, la libération d'insuline en postprandial stimule l'acétyl-CoA-carboxylase (ACC) provoquant l'augmentation de la malonyl-CoA qui inhibe en retour l'entrée d'acyl-CoA dans les mitochondries et donc la destruction des acides gras [58].

La lipogénèse, qui est la partie qui nous intéresse, se déroule en postprandial dans de nombreux tissus, mais essentiellement dans le foie et le tissu adipeux. La décomposition du glucose débouche sur la formation de pyruvate qui est capté par les mitochondries où il est décarboxylé en acétyl-CoA. Le système de transport citrate-malate permet de faire rentrer l'acétyl-CoA de nouveau dans le cytosol où il est carboxylé pour former du malonyl-CoA, grâce à l'ACC qui en détermine la vitesse. Puis des composés à 2 carbones sont assemblés avec un complexe acide gras-synthétase jusqu'à l'obtention de palmitate (16:0).

Comme je le disais précédemment, les hormones jouent un rôle clé dans la lipogénèse, l'insuline, particulièrement qui la stimule au moyen de différents mécanismes. Elle augmente le transport du glucose dans les cellules et donc accroît la disponibilité à la fois du pyruvate pour la synthèse d'acides gras et du glycérol 3-phosphate pour l'estérification des acides gras nouvellement formés. L'insuline transforme la forme inactive de la pyruvate

déshydrogénase en une forme active dans le tissu adipeux mais pas dans [58] le foie. De plus l'insuline est le chef d'orchestre de l'expression génique de l'ACC et de la biosynthèse enzymatique, le glucagon s'opposant à son action [58, 59].

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dont le rôle n'a pas encore été abordé dans ce chapitre est elle aussi un régulateur clé du métabolisme énergétique, principalement glucidique et lipidique. L'AMPK a été d'abord identifiée pour ses actions inhibitrices au niveau hépatique sur l'ACC et sur le 3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-CoA Réductase (HMGR), deux enzymes limitantes respectivement du métabolisme des acides gras et du cholestérol. Les effets d'une activation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique s'observent non seulement au niveau hépatique mais aussi au niveau d'autres tissus périphériques (muscles, tissu adipeux et pancréas) et au niveau central au sein de l'hypothalamus. L'activité de l'AMPK dépend de la variation du rapport AMP/ATP de la cellule en réponse à un stress physiologique ou pathologique. L'AMPK régule ainsi la charge énergétique de la cellule en maintenant constante la concentration en ATP. Une fois activée, l'AMPK stimule les voies cataboliques générant de l'ATP et freine les voies anaboliques consommant de l'ATP [60-63].

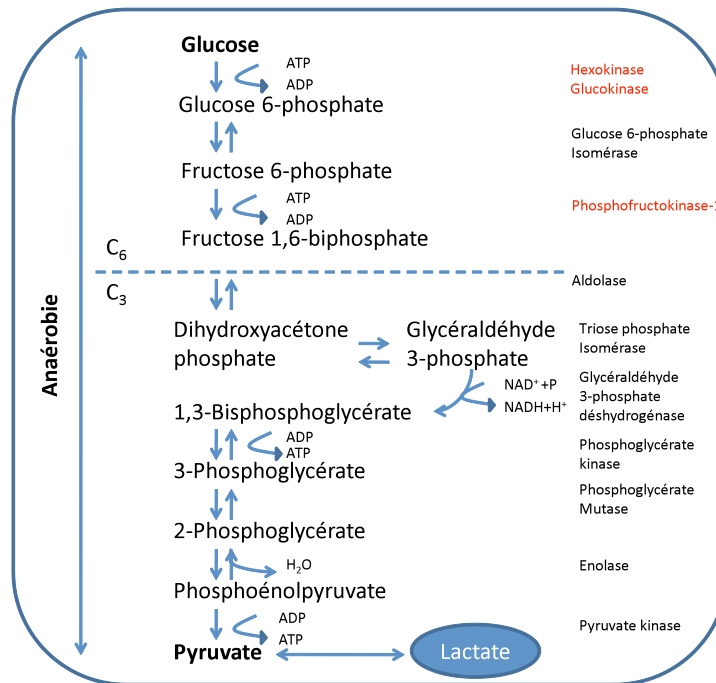
### **2.3.2. Les enzymes clés de la glycolyse cytoplasmique.**

La glycolyse, est la voie principale du métabolisme du glucose qui aboutit à la production de pyruvate. Cette réaction présente dans le cytosol de toutes les cellules est composée de dix étapes. C'est la phase anaérobie de l'oxydation du glucose. Au-delà du pyruvate, l'oxydation du glucose requiert non seulement de l'oxygène moléculaire mais aussi des systèmes enzymatiques mitochondriaux, tel que le complexe pyruvate déshydrogénase, le cycle de l'acide citrique et la chaîne respiratoire. Cependant, cette deuxième partie est une voie particulière car elle peut utiliser l'oxygène s'il est disponible via la chaîne respiratoire de la mitochondrie ou fonctionner en anaérobie. Dans ces conditions le pyruvate est réduit en lactate à l'aide du NADH, cette réaction étant catalysée par la lactate déshydrogénase. La réoxydation du NADH via la formation du lactate permet à la glycolyse de se poursuivre en l'absence d'oxygène.

La plupart des tissus ont un besoin minimal de glucose. Pour quelques-uns, en particulier le cerveau, ce besoin est important, tandis que pour d'autres, par exemple les érythrocytes, il est primordial [58].

La plupart des réactions glycolytiques sont réversibles sauf trois qui sont exergoniques et doivent être considérées comme physiologiquement irréversibles. Ces réactions sont catalysées respectivement par l'hexokinase (HK) et/ou la glucokinase (GK), en fonction des tissus, la PFK et la pyruvate kinase (PK). Ces trois enzymes sont les sites essentiels de la régulation de la glycolyse. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de nous pencher plus spécialement sur la GK (2.7.1.2) et la PFK (2.7.1.56) afin de déterminer si ces deux acteurs étaient modulés par l'AscOOH.

Figure 4 : Schéma résumant la glycolyse cytoplasmique et ses dix réactions :



Légende : ATP : adénosine triphosphate; ADP : adénosine diphosphate; H<sub>2</sub>O : eau; NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

Afin d'entrer dans la glycolyse, le glucose est phosphorylé en glucose 6-phosphate. C'est la glucokinase dans le foie (hexokinase ailleurs), dont l'activité est modulée par l'état nutritionnel, qui catalyse cette réaction. La glucokinase qui a pour fonction d'éliminer le glucose du sang en post prandial a, au contraire de l'hexokinase, une constante de Michaelis ( $k_m$ ) élevée pour le glucose et elle fonctionne de manière optimale à des concentrations de glucose supérieures à 5 mmol/L [64].

Le glucose 6-phosphate est ensuite transformé en fructose 6-phosphate par la phosphohexose isomérase, puis en D-Fructose 1,6-bisphosphate par la PFK.

La PFK qui est constituée de 4 sous-unités (protomères) est l'enzyme la plus lente de la glycolyse. Son activité est modulée à la fois par des activateurs (AMP, Fructose 2,6-biphosphate) et des inhibiteurs (ATP, citrate, NADH, phosphoenolpyruvate). Elle joue un rôle important dans la régulation du taux de glycolyse [65]. Une particularité biochimique de la PFK veut que son activité soit activée dans un environnement oxydé. Il semble, selon Ogasawara, que cette activation de l'activité enzymatique soit liée à une modification des ponts disulfures, via les thiols accessibles de l'enzyme [66]. Si j'aborde cette spécificité de la PFK, c'est parce qu'elle pourrait jouer un rôle dans les effets constatés de l'AscOOH sur la glycolyse.

### **2.3.3. Répercussions chez le nouveau-né d'une perturbation du métabolisme énergétique hépatique.**

Une perturbation du métabolisme énergétique hépatique est lourde de conséquences chez un prématuré. En effet, ce dernier subit de nombreuses agressions métaboliques et physiologiques [20] qui concourent à augmenter fortement ses besoins énergétiques, alors même que ses réserves sont quasi inexistantes. Malgré leur prise en charge dans des unités de soins aigus, il est démontré que la plupart des prématurés présentent les signes d'un déficit calorique lors de leur retour à domicile [20].

Une des séquelles les plus graves qui menace les prématurés à long terme concerne le développement cognitif. Ce dernier est affecté directement dans les premières semaines de

vie par les apports caloriques et protéiques. Il est établi de plus qu'un déficit calorique dans les premières semaines de vie affecte la croissance staturo-pondérale durablement [67].

### 3. Hypothèse et objectif de l'étude.

L'élévation du taux de TG plasmatique chez le nouveau-né provoquée par une NP exposée à la lumière peut être causée par une diminution de la clairance, une diminution de la  $\beta$ -oxydation ou par une synthèse lipidique accrue. L'exposition à la lumière de la nutrition parentérale favorise la formation d'AscOOH. Knafo a suggéré en 2005 que l'AscOOH augmentait la lipogenèse en stimulant l'ACC [45].

**L'hypothèse** soutenant ce travail est que l'AscOOH est l'agent de la nutrition parentérale activant la lipogenèse, responsable de l'élévation des triglycérides (TG) sanguins constatée chez les nouveau-nés prématurés [46].

**L'objectif général** de mon projet de maîtrise est de valider notre hypothèse chez un modèle animal de NP néonatale soit le cochon d'inde nouveau-né. Ceci permettant d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents chez l'humain et ainsi d'améliorer la prise en charge nutritionnelle de ces enfants vulnérables.

**Les objectifs spécifiques** : nous avons décidé d'investiguer les effets biochimiques de l'AscOOH sur la lipogenèse en passant par cinq étapes.

La première étape est de confirmer l'existence d'une relation entre le niveau d'AscOOH urinaire et l'hypertriglycémie plasmatique.

La deuxième étape consiste à vérifier l'activité de deux pièces maîtresses de la lipogenèse, l'ACC et l'AMPK, en fonction des taux d'AscOOH perfusé.

La troisième étape est d'évaluer l'effet de l'AscOOH sur l'apport de substrat pour la lipogenèse en évaluant l'activité de deux enzymes clés de la glycolyse, la GK et la PFK, en fonction des concentrations perfusées de notre molécule.

La quatrième étape consiste à évaluer l'effet oxydant de l'AscOOH et sa possible implication dans l'effet lumière constaté en mesurant le statut redox du glutathion

(GSH/GSSG) de différents tissus (foie, sang total, globules rouges). La mesure des isoprostanes est effectuée ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) afin d'évaluer toute attaque radicalaire.

La cinquième étape est d'estimer si le dosage urinaire des concentrations d'AscOOH chez les nouveau-nés constitue un marqueur prédictif, facilement accessible, des effets métaboliques de l'exposition à la lumière de la NP.



## 4. Méthodologie

### 4.1. Préliminaire de l'étude

Nous avons choisi le cochon-d'inde comme modèle pour notre étude car son profil lipidique ressemble beaucoup plus à celui de l'espèce humaine que d'autres espèces animales utilisées en recherche comme le rat, la souris ou le hamster [68, 69]. Enfin, la taille du cochon-d'inde à sa naissance est suffisante, contrairement aux autres espèces citées ci-dessus, pour que nous puissions lui insérer un cathéter (28G) dans la veine jugulaire.

En nous basant sur l'hypothèse de départ, qui concerne les prématurés, nous avons mimé un modèle néonatal bien établi [8-10, 47, 48, 68, 70-74], en utilisant le cochon-d'inde de 3 jours de vie. Après la procédure chirurgicale (pose de cathéter), les animaux étaient répartis dans 4 groupes et nourris pendant 4 jours exclusivement par voie parentérale (pousse seringue à débit constant sur 24 heures, 240 ml/kg/j) avec une solution glucosée (Dextrose 8.7 % w/v, NaCl 0.35 % w/v, Héparine 1U/ml) contenant de l'AscOOH (en fonction du groupe: 0, 84, 225, 450  $\mu$ M). Les concentrations d'AscOOH ont été choisies afin de refléter les teneurs d'AscOOH générées par l'ajout de MV dans les poches de NP en pratique clinique. Au 7<sup>ème</sup> jour de vie, ils étaient sacrifiés et les organes prélevés pour des analyses ultérieures.

L'AscOOH était produit artificiellement grâce à un système générateur qui contenait dans une solution aqueuse de l'ascorbate (14.4 mmol/l), de la riboflavine (0.03 mmol/l), du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400  $\mu$ mol/l) et du NaOH (17 mmol/l). Cette méthode, mise au point par François Côté lors de sa maîtrise dans le laboratoire du Dr. Lavoie, consiste à recréer artificiellement les conditions de formation de notre molécule. Pour ce faire il faut agiter la solution pendant 48 heures à l'air ambiant (O<sub>2</sub>) et sous la lumière. Après ce laps de temps, la solution est traitée à la catalase (100 U/ml) afin de supprimer toute trace de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vérifié par la technique du xylénol orange) et centrifuger à 5000 x g pendant 15 minutes à 4°C en utilisant des filtres (Centricon Plus 20<sup>®</sup>) pour supprimer toutes traces de catalase. Cette enzyme fait environ

250 kDa et nos filtres retiennent toutes les molécules au dessus de 30 kDa. Ce système générateur produit en moyenne 1.8 mmol/l d'AscOOH, validé par LC-MS.

Selon les consignes du comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche, une grille de surveillance des paramètres cliniques des animaux a été instaurée afin de veiller à leur bien-être. Cette évaluation comportait l'apparence générale de l'animal (poil, museau, gencive, yeux, pattes) et la fréquence respiratoire, la présence ou non d'œdèmes, de tremblement, de gémissement, l'hydratation et la miction. A noter qu'aucune surmortalité ou surmorbidity n'a été observée comparativement aux expériences précédentes menées par le groupe Lavoie.

Afin de ne pas appesantir la lecture de ce document, plusieurs abréviations ont été utilisées dans le prochain chapitre qui décrit les techniques utilisées au cours de ma maîtrise. Ces dernières sont donc présentées ci-dessous.

BSA : albumine bovine sérique, DTT : dithiothréitol, EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique, EDTA-Na<sub>2</sub> : disodium EDTA, EGTA : acide éthylène-glycol-tétraacétique, G6PD : glucose-6-phosphate déhydrogénase, HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazinéthanesulfonique, HPLC : chromatographie en phase liquide à haute pression, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : acide phosphorique, IgG-HRP : immunoglobuline G couplée au peroxydase du raifort, K<sub>3</sub>EDTA : tripotassium acide éthylène-diamine-tétraacétique, KF : fluorure de potassium, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : phosphate de potassium mono-basique, NaCl : chlorure de sodium, NaF : fluorure de sodium, NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : sodium phosphate di-basique, NaOH : hydroxyde de sodium, PBS : tampon phosphate, PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyl, PVDF : polyfluorure de vinyldène, SDS : sulfatedodécylque de sodium, SDS-PAGE : électrophorèse de gel de polyacrylamide du SDS, Tris-HCl : hydrochlorure de trihydroxyméthylaminométhane.

## **4.2. Méthodes présentées dans l'article**

Nous avons soumis l'article au journal scientifique *The Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics* avec l'accord des co-auteurs. Le titre de l'article est le suivant :

*Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the energy metabolism leading to higher plasma triacylglycerol.* La version de cet article présentée au chapitre 5, est la version finale lors du premier dépôt de ce mémoire. Ma contribution à cet article en tant que premier auteur est d'environ 70 % et prend en compte mon implication dans les travaux de recherche (90 %), dans l'analyse et l'interprétation des résultats (70 %), ainsi que ma participation à la rédaction et à la correction de l'article (45 %). Mon directeur de recherche, le Dr. Jean-Claude Lavoie, est impliqué dans l'analyse et l'interprétation des résultats (30 %), ainsi que dans la rédaction et la correction de l'article (45 %). Les autres co-auteurs ont participé à hauteur de 15 % aux travaux de recherche, ainsi qu'à la correction de l'article (10 %).

Le plan expérimental, les procédures expérimentales ainsi que les analyses statistiques sont présentés dans les sections Méthodes et Résultats (*Methods* et *Results*) de l'article. Le journal auquel nous avons soumis notre article demande aux auteurs d'avoir une rubrique "Méthodes" très succinctes, c'est pourquoi dans le prochain chapitre je présente d'une manière plus détaillée toutes les techniques utilisées dans l'article.

Les détails techniques des résultats obtenus durant ma maîtrise, mais qui ne sont pas incorporés dans l'article, sont détaillés dans la rubrique 4.4

Parmi les méthodes présentées dans l'article, j'ai effectué la mise au point des immuno-buvarages de la PFK et de la GK qui ne s'étaient jamais faits dans mon laboratoire d'accueil. Il est délicat en travaillant avec des cochon-d'indes de trouver les bons anticorps, car il n'en existe pratiquement aucun spécifique à cette espèce. De nombreux essais ont été nécessaires en particulier pour la PFK. Pour les autres dosages, j'ai effectué la préparation des échantillons et le dosage de toutes les techniques présentées dans ce manuscrit, à l'exception de l'immuno-buvarage de l'ACC qui a été fait par M. Ali Djoudi (laboratoire du Pr. Levy). Thérèse Rouleau l'assistante de recherche du laboratoire d'accueil a, en plus de son soutien technique au laboratoire, effectué les chirurgies sur les animaux (pose de cathéter, sacrifice et prélèvement d'organes).

## 4.3. Détails des méthodes abrégées de l'article

### 4.3.1. Acétyl-CoA carboxylase

#### 4.3.1.1. Activité enzymatique de l'acétyl-CoA carboxylase

La technique utilisée par le groupe de *Lopaschuk et al* pour la préparation et le dosage des activités enzymatiques est utilisée avec quelques modifications mineures [45, 75-77]. Après avoir dégelé les échantillons de foie sur glace (0.2 g), ils sont homogénéisés dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM mannitol, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>2</sub>-pyrophosphate, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 4 µg/mL d'inhibiteurs de protéases, 1mM benzamidine), puis centrifugés à 14 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Nous prélevons les surnageants et les amenons à une concentration de 2.5 % de PEG 8000 (solution de 25% (g/v) de polyéthylène glycol 8000), ils sont incubés 10 minutes sur lit de glace avec agitation et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont à leur tour ajustés à une concentration de 6 % de PEG 8000 (avec une solution 25 % PEG), incubés 10 minutes sur glace et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Après quoi les culots sont suspendus dans 1 mL d'une solution 6 % de PEG 8000 et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont remis en suspension dans 500 µL du tampon B (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>2</sub>-pyrophosphate, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, 10 % glycerol (v/v), 4 µg/mL inhibiteurs de protéases, 1mM benzamidine, 0.02 % sodium azide (g/v)). Un dosage des protéines selon la technique *Bradford* [78] (réactif BioRad™ et albumine de sérum bovin pour la courbe étalon) est réalisé sur 20 µL de la suspension et le reste congelé à -80°C jusqu'au moment du dosage.

L'activité de l'ACC est évaluée en mesurant l'incorporation d'un marqueur radioactif (<sup>14</sup>C-bicarbonate) à l'acétyl-CoA puis en mesurant la radioactivité provenant du <sup>14</sup>C-malonyl-CoA produit par cette réaction. Le milieu réactionnel est composé de 145 µL d'un tampon de réaction complet (60.6 mM Tris acétate, pH 7.5, 1mg/mL BSA, 1.3 µM β-mercaptoéthanol, 5 mM acétate de magnésium, 2.1 mM ATP, 1.1 mM acétyl-CoA) et de

12.5  $\mu\text{L}$  d'un tampon de réaction partiel, qui contient ou non 100 mM de glutamate comme activateur (60.6 mM Tris acétate, pH 7.5, 1 mg/mL BSA, 1.3  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoéthanol, 5 mM acétate de magnésium). Les échantillons sont dilués dans le tampon partiel afin d'obtenir une concentration de 25 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ . De cette dilution 5 $\mu\text{L}$  sont ajoutés au milieu réactionnel et incubés 20 minutes à 37°C. L'ajout de 18.3 mM (du volume final) de  $\text{NaHCO}_3$  (contenant  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  pour 1000 dpm/nmol) initie une réaction de 5 minutes qui est stoppée par l'ajout de 25  $\mu\text{L}$  d'acide perchlorique 10%. Il y a ensuite une incubation sur glace de 15 minutes et une centrifugation de 20 minutes à 1000 x g. Les surnageants sont prélevés, séchés sous hotte et leur radioactivité mesurée à l'aide d'une technique utilisant un liquide de scintillation. Afin de nous assurer de la stabilité de la réaction nous mesurons deux fois à deux jours d'intervalles les échantillons. Les résultats sont exprimés en nmole de Malonyl-CoA produit/min/mg de protéines.

#### 4.3.1.2. Immuno-buvardage de l'acétyl-CoA carboxylase.

Cinquante mg de foie dégelé sur glace sont homogénéisés dans 10 volumes (p/v) d'un tampon de lyse maintenu à 4°C (50 mM HEPES, pH 7.50, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EGTA, 1% Triton-100 X, 50 mM NaF, 10 % glycérol (v/v), 1 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  et deux anti-protéases : 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aproténine et 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin). L'homogénat est centrifugé à 9400 x g durant 20 minutes à 4°C et le surnageant est stocké à -80°C jusqu'au dosage. Le dosage des protéines est effectué selon la technique *Bradford*. 50  $\mu\text{g}$  de protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (8%) à 170 Volts pendant 50 minutes. Le transfert sur membrane PVDF s'effectue à 100 Volts pendant 70 minutes en chambre froide afin de maintenir le tampon de transfert à 4°C. Après un blocage des membranes de 1 heure (5 % (p/v) lait maigre, 0.2 % (v/v) PBST) et 3 rinçages de 5 minutes (0.1 % (v/v) PBST) la membrane est incubée toute une nuit à 4°C avec le premier anticorps polyclonal pour l'ACC totale (1 : 500) (Cell Signaling Technology, MA, USA). Le lendemain après 3x10 minutes de rinçage (0.1 % (v/v) PBST), l'incubation avec le deuxième anticorps chèvre anti-lapin IgG-HRP (1:20 000) (Promega Corporation, WI, USA) dure 1 heure à température pièce (25°C). Suite à cela, 4x15 minutes de rinçage (0.1 % (v/v) PBST) sont nécessaires avant la révélation par chimiluminescence à l'aide de Western Lightning™ sur

des films à rayons X. L'analyse et la quantification des bandes se fait par densitométrie. La protéine de référence utilisée dans tous nos immuno-buvardages est la vinculine, qui est une protéine du cytosquelette (1:2500) (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan). Elle est incubée dans les mêmes conditions que les protéines citées et révélée avec du SuperSignal West Femto® (100 %).

### **4.3.2. Phosphofructokinase**

#### **4.3.2.1. Activité enzymatique de la phosphofructokinase**

Pour mesurer l'activité enzymatique de la PFK, nous utilisons les techniques d'Hamer et Karadsheh [79, 80]. Nous homogénéisons 0.5 g de foie dans 9 volumes (p/v) d'un tampon gardé sur lit de glace (50 mM triéthanolamine pH 7.35, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 15 mM KF, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM EGTA). L'homogénat est ensuite centrifugé 2 minutes à 10 000 x g (4°C). Les surnageants sont centrifugés une deuxième fois 10 minutes à 10 000 x g (4°C), afin d'obtenir un surnageant qui est conservé à -80°C jusqu'au dosage. L'activité de la PFK est mesurée en déterminant le taux de formation de fructose-1,6- $\text{P}_2$  à température pièce (25°C). La réaction est initiée par l'ajout de 40  $\mu\text{L}$  de la suspension contenant la PFK, dans 1 mL de tampon de réaction (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM fructose-6-P, 1 mM ATP, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.16 mM NADH, 2.5 mM DTT, 1mM EDTA, 5 mM  $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ , 0.4 unité d'aldolase, 2.4 unités de triose phosphate isomérase, 0.4 unité  $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase). L'absorbance de la réaction à 340 nm est mesurée avec un photospectromètre pendant 10 minutes. La pente ( $\Delta \text{DO}/\text{min}$ ) correspond au coefficient d'extinction du NADH. L'oxydation de 2  $\mu\text{mol}$  de NADH correspond à la production de 1  $\mu\text{mol}$  de fructose-1,6- $\text{P}_2$  par minute. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

#### **4.3.2.2. Immuno-buvardage de la phosphofructokinase**

En nous basant sur les protocoles d'Abnous et Rideau [81, 82] nous homogénéisons 0.3g de foie dans 2 volumes (p/v) d'un tampon gardé sur lit de glace (10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 2mM Orthovanadate sodium, 1 % (v/v) Triton X-100, 0.01 % (v/v) SDS 10 %, 2mM PSMF), puis nous ajoutons un inhibiteur

de protéases (1 tablette complète pour 20 mL de tampon). L'homogénat est ensuite agité pendant 1 heure à 4°C et centrifugé à 6300 x g pendant 30 minutes (4°C) et le surnageant est à nouveau centrifugé à 18 000 x g pendant 45 minutes (4°C). Ce dernier surnageant est aliquoté et stocké à -80°C jusqu'au dosage. 20 µL du surnageant final sont utilisés pour déterminer avec la technique de *Bradford* la teneur en protéines. 50 µg de protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (8%) à 100 Volts pendant 90 minutes. Le transfert sur membrane PVDF s'effectue à 90 Volts pendant 2 heures en chambre froide afin de maintenir le tampon de transfert à 4°C. Après un blocage des membranes de 1 heure (5 % (p/v) lait maigre, 0.2 % (v/v) PBST) et 3 rinçages de 5 minutes (0.1 % (v/v) PBST), la membrane est incubée toute une nuit à 4°C avec le premier anticorps PFK-1 polyclonal (1:1000), (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Le lendemain après 3x10 minutes de rinçage (0.1 % (v/v) PBST), l'incubation avec le deuxième anticorps chèvre anti-lapin IgG-HRP (1:5000) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) dure 1 heure à température pièce (25°C). Suite à cela, 4x15 minutes de rinçage (0.1 % (v/v) PBST) sont nécessaires, avant la révélation par chimiluminescence à l'aide de SuperSignal West Pico® (50 %) et SuperSignal West Femto® (50 %) sur des films à rayons X. L'analyse et la quantification des bandes se fait par densitométrie. La protéine de référence utilisée est la vinculine (1:2500) (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) révélée avec du SuperSignal West Femto® (100 %).

### **4.3.3. Glucokinase**

#### **4.3.3.1. Activité enzymatique de la glucokinase**

Selon les techniques publiées [83, 84] nous homogénéisons 0.5g de foie dans un 2 volumes (p/v) tampon maintenu à 4°C (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 0.7 µL/mL 2-mercaptoethanol). Après une centrifugation initiale de l'homogénat pendant 10 minutes à 1400 x g (4°C), le surnageant obtenu est centrifugé une deuxième fois pendant 10 minutes à 12 000 x g (4°C), le surnageant est conservé sur lit de glace et le culot est suspendu dans 500 µL de tampon d'homogénéisation et soumis à une

troisième centrifugation identique à la précédente. Les surnageants de la deuxième et troisième centrifugation sont combinés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant le dosage.

L'hexokinase et la glucokinase 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.

Le calcul de l'activité enzymatique se fonde sur une mesure à haute (100 mM) et à basse (0.5 mM) concentration de glucose. Pour chaque échantillon, trois mL de tampon de réaction (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM NADP, 5 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 U G6PD et 100 ou 0.5 mM glucose) sont versés dans un tube "haute concentration" et "basse concentration". Les tubes sont pré-incubés 10 minutes à  $30^{\circ}\text{C}$ , puis 20  $\mu\text{L}$  du surnageant hépatique final (200  $\mu\text{g}$  de protéines) sont ajoutés dans les tubes. La réaction dure 60 minutes. Une fois les échantillons revenus à température pièce ( $25^{\circ}\text{C}$ ) nous évaluons avec un photospectromètre à 340 nm le degré d'absorption de la lumière. Pour connaître l'activité enzymatique de la GK nous soustrayons de l'activité totale à haute concentration de glucose (GK+HK) la valeur à basse concentration (HK). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

#### **4.3.3.2. Immuno-buvardage de la glucokinase**

L'immuno-buvardage de la GK se base sur le même protocole que celui de la PFK, les membranes sont ensuite incubées toute une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  avec un premier anticorps GK polyclonal, anti-humain (1:1000) (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan), puis avec un deuxième anticorps chèvre anti-souris IgG-HRP (1:5000) (R&D Systems, Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada). La protéine de référence (vinculine) est utilisée dans les mêmes conditions que précédemment.

#### **4.3.4. GSH et GSSG**

Selon la technique publiée [85], immédiatement après le sacrifice des animaux, nous récoltons le plasma et 150  $\mu\text{L}$  de globules rouges après avoir centrifugé 1 mL de sang



pendant 4 minutes à 7200 x g. En plus des globules rouges, 200 µL de sang et 0.5g de foie sont mélangés avec respectivement 450 µL, 600 µL et 2.5 mL d'acide métaphosphorique 5% (p/v) fraîchement préparé et gardé sur glace. L'acide métaphosphorique ralentit les processus oxydatifs. Les globules rouges et le sang sont vortexés 5 secondes et le foie homogénéisé 3x10 secondes sur glace à l'aide d'un polytron™. Suite à cela, les trois préparations sont centrifugées 1 minute à 7200 x g. Les surnageants et les culots sont conservés à -80°C jusqu'à la détermination des teneurs en glutathion dans les surnageants et des protéines dans les culots.

La mesure des formes réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion est réalisée par électrophorèse (75 mM acide borique, 25 mM Bis-Tris, pH 8.4, 28°C, 18 kV) capillaire (75 µm x 50 cm silice) et détectée à 200 nm sur un système P/ACE MDQ (Beckman). Nous utilisons comme courbe standard externe des solutions de GSH (500 µM) et GSSG (50 µM) conservées à -20°C et qui sont diluées le jour du dosage dans respectivement 1/10 et dans 1/100 d'acide métaphosphorique 1% (p/v). C'est l'équation de Nernst (25°C, pH 7.0) qui est utilisée pour calculer la réduction du potentiel redox du glutathion cellulaire. Cette équation se base sur la variation de sa concentration intracellulaire.

#### **4.3.5. Triglycérides et cholestérol (plasmatiques et hépatiques)**

Les dosages plasmatiques et hépatiques des TG et du cholestérol se font sur 10 µL de plasma et 50 µL d'extrait lipidique du foie (méthode de *Folch*) à l'aide de deux kits commerciaux (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Le principe du dosage des TG est d'hydrolyser ces derniers en présence d'une lipoprotéine lipase, afin que le glycérol obtenu soit oxydé pour former du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> essentiel à la formation d'une couleur détectable à 500 nm. Lors de ce dosage, du glycérol est utilisé comme courbe étalon. Le dosage du cholestérol repose sur le même principe que les TG, c'est l'action de deux enzymes (une cholestérol estérase et une cholestérol oxydase) dont l'action combinée génère du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La technique de *Folch* [86] qui permet l'extraction des lipides hépatiques est la suivante : environ 0.2 g de foie sont dégelés sur glace et homogénéisés dans deux volumes (p/v) d'une solution saline (0.9 % NaCl). Le dosage des protéines de l'homogénat est réalisé sur 20 µL

de ce dernier selon la méthode de *Bradford* décrite plus haut. L'extraction continue en mélangeant et en agitant 1 heure à 4°C, 100 µL d'homogénat à 2 mL de Folch (solution de chloroforme et méthanol 2 : 1(v/v)). Suite à cela 400 µL de salin (0.9 % NaCl) sont ajoutés et la solution est centrifugée à 3800 x g durant 10 minutes à température pièce (25°C). La phase inférieure (organique) est prélevée et séchée sous un flux d'azote. Les échantillons sont reconstitués par l'ajout de 100 µL de *Folch* et 125 µL d'une solution de Thésit™ dilué à 20 % dans le chloroforme (p/v). Les échantillons sont séchés sous un flux d'azote et le culot lipidique mis en suspension dans 1250 µL d'eau de qualité nanopure. Le dosage des lipides hépatiques est finalement effectué sur cette suspension finale. Les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéines pour l'extrait de foie et en mM pour le dosage plasmatique.

#### 4.3.6. Isoprostane

Nous utilisons un kit commercial immuno-enzymatique (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) afin de mesurer le niveau de 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  dans le foie. Le principe du dosage des isoprostanes est basé sur la compétition entre le 8-isoprostane de l'échantillon et un traceur (8-isoprostane acetylcholinestérase) qui se lie à un nombre limité de sites contenant un anti-sérum spécifique au 8-isoprostane. La réaction génère ou non une couleur (jaune) qui est ensuite lue au photospectromètre à 412 nm.

En nous basant sur une technique publiée [9], nous extrayons les prostaglandines sur colonne (Sep Pak C18, Waters, MA, USA) à partir de 0.2g de foie conservé à -80°C. Les échantillons sont dégelés sur glace et homogénéisés dans quatre volumes (p/v) d'un tampon maintenu à 4°C (50 mM Tris Base, pH 7.40, 0.1 mM EDTA, 200 µM d'indométhacine). L'indométhacine est utilisée afin de bloquer la cyclo-oxygénase, une enzyme de synthèse des prostaglandines. L'homogénat est ensuite centrifugé 10 minutes à 7200 x g à température pièce (25°C). Le dosage des protéines est effectué selon la méthode *Bradford*. 500 µL du surnageant sont mélangés à 500 µL du tampon décrit ci-dessus.

Avant l'extraction des isoprostanes, nous conditionnons les colonnes avec le passage de 15 mL d'éthanol, puis 15 mL d'eau nanopure à travers ces dernières. Les échantillons reçoivent

180  $\mu$ L d'éthanol et 25  $\mu$ L d'acide formique. A ce stade les échantillons sont passés sur la colonne et pénètre dans la résine de cette dernière. S'ensuivent d'abord deux rinçages des colonnes avec 15 mL d'éthanol 15 % et 15 mL d'éther de pétrole (ACS grade) et enfin le passage de 10 mL d'acétate d'éthyle qui sont récoltés et évaporés sous hotte. Le résidu est solubilisé dans 400  $\mu$ L de tampon phosphate 0.1 M à pH 7.40 (39 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 61 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) et conservé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au dosage. Les résultats sont exprimés pg / mg protéines.

## **4.4. Autres méthodes non insérées dans l'article**

### **4.4.1. Protéine Kinase Activée par l'AMP**

#### **4.4.1.1. Activité enzymatique de l'AMPK**

La préparation des échantillons est la même que pour l'ACC. Environ 200 mg de foie sont homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation froid (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM mannitol, 50 mM sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 4  $\mu$ g/ml inhibiteur de protéase, 1mM Benzamidine) puis centrifugés à 14 000 x g pendant 20 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Nous prélevons les surnageants et les amenons à une concentration de 2.5 % de PEG 8000 (solution de 25% (g/v) de polyéthylène glycol 8000), ils sont incubés 10 minutes sur lit de glace avec agitation et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Les surnageants sont à leur tour ajustés à une concentration de 6 % de PEG 8000 (avec une solution 25 % PEG), incubés 10 minutes sur glace et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Après quoi, les culots sont suspendus dans 1 mL d'une solution 6 % de PEG 8000 et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Les culots sont remis en suspension dans 500  $\mu$ L du tampon B (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaF, 5 mM  $\text{Na}_2$ -pyrophosphate, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1mM DTT, 10 % glycerol (v/v), 4  $\mu$ g/mL inhibiteurs de protéases, 1mM benzamidine, 0.02 % sodium azide (g/v)). Un dosage des protéines selon la technique *Bradford* [78] (réactif BioRad et albumine de sérum bovin pour la courbe étalon) est réalisé sur 20  $\mu$ L de la suspension et le reste congelé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au moment du dosage.

Avant d'initier la réaction, l'échantillon (4 µg de protéine) est incubé 5 minutes à 30°C dans 15 µL de tampon de réaction complet (40 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 80 mM NaCl, 8 % glycérol, 0.8 mM EDTA, 0.8 mM DTT, 200 µM SAMS, avec ou sans 200 µM 5'-AMP comme activateur). L'ajout de 200 µM (du volume final) d'ATP (contient  $AT^{32}P$  pour 500 dpm/pmol) déclenche la réaction. Cette dernière est stoppée après 5 minutes par le prélèvement de 15 µL du milieu qui est appliqué sur un papier de phosphocellulose de 1 cm<sup>2</sup> (P81 de Whatman). Les papiers sont séchés 60 minutes, puis transférés dans des tubes de scintillations et lavés 4x 20 minutes dans une solution contenant 150 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et 1x 20 minutes dans de l'acétone. Ces lavages permettent d'éliminer toute trace résiduelle d' $AT^{32}P$  qui ne serait pas lié au SAMS. Après ces rinçages les papiers sont séchés durant une nuit sous hotte et la radioactivité est comptée à l'aide d'une technique utilisant un liquide de scintillation.

La détermination de l'activité de l'AMPK est basée sur l'incorporation de P<sup>32</sup> ( $AT^{32}P$ , 3 Ci/mme, Amersham) dans un peptide SAMS (HMRSAMSGHLVKRR) correspondant à la séquence de l'ACC phosphorylée par l'AMPK. L'ajout de 200 µM 5'-AMP augmente l'activité de l'AMPK par un effet allostérique direct en facilitant sa phosphorylation. L'ajout ou non du 5'-AMP dans le tampon de réaction permet ainsi de connaître l'activité basale et activée de l'AMPK. L'activité est exprimée en pmol de P<sup>32</sup> incorporé dans SAMS/min/mg de protéines

## **5. Article soumis au journal scientifique *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***

La version finale de l'article soumise au *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, est présentée dans ce chapitre. Veuillez noter que les sources documentaires de cet article sont indépendantes de celles du mémoire et elles sont citées à la fin de ce manuscrit.

### **Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the lipid metabolism in newborn guinea pig**

Raffi Maghdessian, François Côté, Thérèse Rouleau, Ali Ben Djoudi Ouadda, Émile Levy, Jean-Claude Lavoie.

Department of Nutrition (RM, ABDO, EL, JCL) and Paediatrics (FC, TR, JL), CHU Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal, Qc, Canada

Running title: **Ascorbylperoxide on glycolysis and lipogenesis**

For correspondence:

Jean-Claude Lavoie, Ph.D

Research Centre

Sainte-Justine Hospital

3175 Côte Ste-Catherine

Montreal, Qc, CANADA, H3T 1C5

Telephone: (514) 345-4931 #3940

FAX: (514) 345-4801

**ABSTRACT**

**Introduction:** The light exposure of parenteral nutritive solutions generates peroxides such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ascorbylperoxide. This absence of photo-protection is associated with higher plasma triacylglycerol concentration (TG) in premature infants and, in animals, with oxidative stress and a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> independent hepatic steatosis. We hypothesized that ascorbylperoxide is the active agent leading to high TG. The aim was to investigate the role of ascorbylperoxide on glucose and lipid metabolism in an animal model of neonatal parenteral nutrition.

**Method:** Three day-old guinea pigs received, through a catheter in jugular, solutions containing dextrose+ 0, 90, 225 or 450 µM ascorbylperoxide. After 4 days, blood and liver were sampled and treated for determinations of TG, cholesterol, markers of oxidative stress (redox potential of glutathione & F<sub>2α</sub>-isoprostane) and activities & protein levels of acetylCoA carboxylase (ACC), glucokinase (GK) and phosphofructokinase (PFK). Ascorbylperoxide concentration was measured in urine of the last day. Data were compared by ANOVA, p<0.05.

**Results:** Plasma TG and cholesterol as well as hepatic PFK activity increased (200% of control), whereas ACC activity decreased (66% of control), in function of amount of ascorbylperoxide infused. Both markers of oxidative stress were higher in animals receiving the highest ascorbylperoxide. The logarithmic relations between urinary ascorbylperoxide and plasma TG ( $r^2=0.69$ ) and hepatic PFK activity ( $r^2=0.26$ ) were positive, whereas it was negative with ACC activity ( $r^2=0.50$ ).

**Conclusion:** The ascorbylperoxide contaminating the parenteral nutrition stimulates glycolysis allowing higher availability of substrates for lipid synthesis. The logarithmic relation between urinary ascorbylperoxide and plasma TG suggests a very low efficient concentration.

Intravenous nutritive support is essential for those who cannot be fed by mouth. This mode of nutrition is frequent in premature infants born before 28 weeks of gestation in whom the gastro-intestinal track is immature. Parenteral nutritive solutions are compounded to provide all essential nutrients to sustain the growing and development of neonates (Gunn et al., 1978). However, as administered, without adequate photo protection, some nutritive elements are lost and undesirable new molecules are generated. Indeed, exposure to ambient light induces a loss of antioxidant vitamins (Silvers et al., 2001) and generates nutrients oxidation by-products such as peroxides (Helbock et al., 1993; Lavoie et al., 1997-2004, Neuzil et al., 1995; Knafo et al., 2005). Paradoxically, the main source of peroxides is the multivitamins moiety of parenteral nutritive solution (Lavoie et al., 1997). The photo-excited riboflavin catalyzes the electron transfer to dissolved oxygen to produce superoxide anion and singlet oxygen which react with electron donors such as lipid, amino acids and ascorbate to generate peroxide (Helbock et al., 1993; Knafo et al., 2005; Laborie et al., 1998; Lavoie et al., 1997). Eighty percent of these peroxides are H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lavoie et al., 1997).

In infants, the absence of photo-protection of parenteral nutrition is associated with higher concentration of peroxide in urine (Laborie et al, 2000), glucose in blood and triacylglycerol in plasma (Khashu et al, 2009). These observations were prevented by a light protection from the preparation of the nutritive solution to the delivery to the infants. In animals, photo-exposed parenteral nutrition induced oxidative stress (Lavoie et al., 2000; Chessex et al., 2001) and hepatic steatosis (Chessex et al., 2002). Since this fatty liver was not associated to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contaminating the infused solutions (Chessex et al., 2002), a new compound deriving from the action of light on parenteral nutrition was suspected. Knafo et al (2005) reported that the interaction between dehydroascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, both generated during light-exposure, leads to the formation of the new molecule 2,3-diketo-4-hydroxyperoxyl-5,6-dihydroxyhexanoic acid, named ascorbylperoxide. The concentration of this molecule rises in urine of animal infused with increasing amount of parenteral

multivitamins and was associated with the activation of the acetylCoA carboxylase (ACC), a limiting enzyme of lipogenesis.

We hypothesized that the high plasma triacylglycerol concentration (TG) observed in premature infants receiving a parenteral nutritive solution without photo-protection is caused by ascorbylperoxide contaminating their parenteral nutrition. The implication of oxidative stress is suspected since ascorbylperoxide has an oxidative (peroxide) function. The present study wanted to investigate the lipogenic effect of ascorbylperoxide in animal model of neonatal parenteral nutrition by infusing during four days a solution containing dextrose + ascorbylperoxide. Since, here, the only carbon source for TG synthesis was glucose, the aim of the study was to measure TG in function of oxidative stress markers as well as the activity of key enzymes of lipogenesis (ACC) and glycolysis (glucokinase and phosphofructokinase).

## **METHODS**

### Animal Model and protocol

Three-day old Hartley guinea pigs (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) received through a catheter in jugular, a continuous intravenous infusion (220 mL/kg/d) of basal solution (8.7% (w/v) dextrose + 0.35% (w/v) NaCl + 1U/mL heparin) enriched with ascorbylperoxide (0, 90, 225 or 450  $\mu$ M); they were not enterally fed. Animals were on 12:12 hours light: dark cycle and the solutions were changed daily four hours after beginning the light cycle. This model was previously used to study the impact of parenteral nutrition or peroxides on hepatic oxidative stress (Chessex et al, 2001) and lipid metabolism (Chessex et al, 2002). Urine of the last day was collected for ascorbylperoxide determination. After four days, under anesthesia (ketamine/xylazine), blood was sampled from aortic puncture whereas the liver was washed from blood by flushing 30 mL of cold 0.9% NaCl solution from hepatic vein to portal artery, collected and rapidly minced on ice. One aliquot was treated for glutathione determination whereas the remaining hepatic tissues were separated in different fractions. Liver samples as well as plasma aliquots were kept at



-80°C until biochemical determinations. The protocols were carried out in accordance with the Canadian Council of Animal Care guidelines.

#### Ascorbylperoxide generating system

Ascorbylperoxyde is a new molecule identified in solutions containing ascorbate such as parenteral nutrition (Lavoie et al., 2004; Knafo et al., 2005). The pure molecule does not commercially exist. Therefore, for the purpose of the study the following generating system was used. According to characteristics of the chemical reaction (Knafo et al., 2005), a solution containing 1.8 mM ascorbate + 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 30  $\mu$ M riboflavin (pH 7 adjusted with NaOH 1N) was incubated at room temperature with strong stirring (to favor dissolution of atmospheric oxygen) under ambient light exposure (75 foot-candle) for 48 hours (for complete consumption of ascorbate confirmed by mass spectrometry). A similar system, but without ascorbate, was used to generate the control solution (no ascorbylperoxide). The solutions were treated 20 min with 100 U/mL catalase and filtered against a 30 kDa filter Centricon Plus-20 (Millipore Corporation); the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was controlled using the FOX assay (Jiang et al, 1991). A dilution of this solution generating 1800  $\mu$ M ascorbylperoxyde was used to prepare the final solutions containing 90, 225 or 450  $\mu$ M ascorbylperoxide. The infused solutions were replaced each day by new freshly prepared solutions.

#### Analytical Measurements

##### *Ascorbylperoxide*

Based on previous study (Knafo et al., 2005), ascorbylperoxide in infused solution as well as in urine was quantified by using Agilent LC/MS 1100 mass spectrometer and L-2-oxo-thiazolidine 4-carboxylic acid (OTC) (Aldrich Chemical), as internal standard. Urine samples were centrifuged 1 min at 7000 x G before used. Five  $\mu$ L of 2.5 mM OTC were added to 95  $\mu$ L of sample and 4  $\mu$ L of this solution were injected on LC column ZORBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> (Agilent). The elution was performed with isocratic mixture of ammonium acetate 10 mM (pH 7) : acetonitril (1:1) at 0.4 mL/min. Retention time was 2.6-

2.8 min for ascorbylperoxide and 4.0 – 4.3 min for OTC. Ascorbylperoxide and OTC were quantified by monitoring ion abundance at  $m/z$  207 (ascorbylperoxide), 147 (OTC) and 293 (OTC dimer) from electrospray ionization mass spectrometry (Agilent 1100 single quadrupole) (negative mode, 25V, source temperature of 350°C, nitrogen nebulizer gas flow of 12 L/min). The inter-assay coefficient of variation for ascorbylperoxide in urine was 4% whereas it was 11% for the intra-assay.

Total OTC abundance (abundance at 147  $m/z$  + 2 fold abundance at 293) was used as internal standard. Its linearity was excellent ( $r^2 > 0.99$ ) until 1 mM. The linear correlations between the ratio ascorbylperoxide / OTC (abundance / abundance) and the increasing amounts of OTC (ascorbylperoxide constant) or of ascorbylperoxide (OTC constant) were greater than 0.99. These linear correlations demonstrate the absence of interaction between OTC and ascorbylperoxide into the assay. The stability of OTC was not affected by the pH (2 to 9) or freezing at -20°C (until 168 days). Whereas ascorbylperoxyde concentration at -80°C decreases in function of time ( $y = 0.30 \% \cdot d^{-1} \cdot x + 100\%$ ,  $r^2 = 0.83$ ).

### *Glutathione*

Immediately after sampling, 0.5 g of liver was homogenized (2 x 10 sec with Polytron Teador™) in 2.5 ml of iced and freshly prepared 5% (w/v) metaphosphoric acid and centrifuged 3 min at 7200 x g. Pellets and supernatants were kept at -80°C until protein and glutathione determinations respectively. GSH and GSSG were quantified by capillary (75µm x 50cm silica) electrophoresis (75 mM boric acid and 25 mM Bis-Tris, pH 8.4, 28°C, 18 kV) as previously described (Lavoie et al, 2008, Turcot et al, 2009). The redox potential refers here to the half-cell reduction potential of the GSSG (2H<sup>+</sup>/2GSH couple) and it was calculated by using the Nernst equation (25°C, pH 7.0) (Schafer et al, 2001).

### *8-Isoprostane F<sub>2α</sub>, triacylglycerol, total cholesterol, blood glucose*

Isoprostane levels were determined by using a commercial enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) as previously reported (Chessex et al, 2002),

triacylglycerol and total cholesterol were measured by using an enzymatic colorimetric test from Roche Diagnostics (Turcot et al, 2009). Blood glucose was quantified with the OneTouch Ultra glucometer (Johnson & Johnson).

#### *AcetylCoA carboxylase activity*

ACC activity was measured on the 6% PEG 8000 (Sigma-Aldrich) fraction (Kudo et al, 1995) as previously reported (Turcot et al, 2009). The measurement was based on the addition of carbon atom from  $^{14}\text{C}$  bicarbonate ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ; 14 mCi/mmol; Sigma-Aldrich) on acetyl-CoA and was expressed as nmol malonyl-CoA produced/min/mg protein. The assay was performed after pre-incubation in presence or not of 7.5 mM glutamate, which revealed the total activity of the enzyme by stimulating phosphatase protein 2A (Gaussin et al, 1996).

#### *Glucokinase activity*

The activity was determined according to the method described by Ferre et al (1996) and Xu Ming-Zhi et al (2004). Briefly, GK were measured spectrophotometrically on 23 000x g supernatant of liver homogenate in a system coupled with G-6-P dehydrogenase after a 20 min incubation at 37°C. Difference in activities obtained by using 100 and 0.5 mM glucose as substrate, corresponds to the glucokinase activity

#### *Phosphofructokinase-1 activity*

The activity was determined according to the method of Hamer et al (1987) and Karadesh et al (1977). Briefly, PFK-1 was assayed by the measurement of NADH oxidation at 340nm on 100 000 x g supernatant of liver homogenate in a system coupled with aldolase, triose phosphate isomerase and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase.

#### *Western blots – Phosphofructokinase and Glucokinase*

According to the method of Abnous (2008) and Rideau (2008), 300 mg of liver were homogenized in 0.6 mL buffer (pH 7.4) containing 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 2mM orthovanadate sodium, 1% (v/v) Triton X-100, 0.01% (v/v) SDS 10%, 2mM PSMF and protease inhibitor cocktail (1 complete tablet / 20ml; Roche Diagnostics). After one hour incubation at 4°C, the suspension was centrifuged (4°C) 30 min at 6300 x G. The supernatant was centrifuged (4°C) 45 min at 18 000 x g. Fifty µg from supernatant were separated on 8% polyacrylamide electrophoresis (100V - 90 min) and electroblotted onto PVDF membrane (90V - 2 hours at 4°C). The membrane was incubated overnight at 4°C with the first anti-body (polyclonal anti-human GK (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) (1: 1000), PFK-1(H-55) polyclonal (Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA) (1:1000) and monoclonal anti-mouse vinculin (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) (1:2500)) and 1 hr with the second antibody (goat anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (R&D Systems, Cedarlane Labs) (1:5000)). After washing (4x15 min), the second anti-body was revealed by chemiluminescence (25% SuperSignal West Femto : 75% SuperSignal West Pico; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) on X-ray film. The quantification was done by densitometry (Fluor Chem 8800 imaging system).

*Western blot – AcetylCoA carboxylase*

According to the method of Ouadda (2009), 50 mg of frozen liver were homogenized in 0.5 mL buffer (pH 7.5) containing, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton-100 X, 50 mM NaF, 10% glycerol, 1mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin and 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. After centrifugation (13 000 rpm, 20 min, 4°C), 25 µg of protein from supernatant were separated on 8% polyacrylamide electrophoresis (170V - 50 min), electro-blotted onto PVDF membrane (100V – 70 min at 4°C) and blocked (1 hour at room temperature) with skimmed milk at 5% in PBS-Tween20. The membranes were incubated overnight at 4°C with the polyclonal anti-human ACC (Cell Signaling Technology, MA, USA) (1: 500) and the monoclonal anti-mouse vinculin (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) (1:2500) followed by 1 hr incubation with goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody (Promega Corporation, WI, USA) (1:20 000). After four washing (15 min), the result was revealed by chemiluminescence (100 % Western

Lightning™ Chemiluminescence Reagent, PerkinElmer, MA, USA) on X-ray film. The quantification was done by densitometry (Fluor Chem 8800 imaging system).

### Statistical analysis

Data were presented as mean  $\pm$  s.e.m. and were compared by ANOVA after validation of homoscedasticity using Bartlett's Chi square test. Logarithmic transformation of GSH, GSSG and ACC Western blot data was used to meet homoscedasticity. The orthogonal comparisons used were [(0 vs. 1  $\mu$ mol/d ascorbylperoxyde group) vs. 4  $\mu$ mol/d] vs. 7  $\mu$ mol/d] in order to statistically document the lowest efficient concentration of ascorbylperoxide. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

The initial body weight ( $106 \pm 3$  g), as well as final body weight ( $100 \pm 2$  g) and liver weight ( $3.6 \pm 0.1$  g or  $37.0 \pm 1.8$  mg/g of body weight), did not differ between groups ( $F_{(1,23)} < 3.9$ ). Blood glucose was similar ( $F_{(1,19)} < 2.3$ ) between groups ( $8.0 \pm 0.4$  mM).

The exact amounts of ascorbylperoxide received by animals were reported in **Table 1** and they are used in figures to qualify the four groups. Data shown that ascorbylperoxide is eliminated in urine. The concentration measured in urine from animals that did not be infused with ascorbylperoxide suggests an endogenous generation of this molecule. The threshold of this endogenous value (95% confidence) was 0.80  $\mu$ mol/ mg creatinine or 54  $\mu$ M. By deducting this limit to urinary concentration of ascorbylperoxide, the calculated recovery in urine increased in function of infused amount and reached a plateau greater than 80% with the infusion of 4  $\mu$ mol/d (Table 1).

To challenge the hypothesis of an impact of ascorbylperoxide on TG, the experimental design allowed to investigate two options: modification of fatty acids synthesis, characterized here by the ACC activity, and modification of the substrate availability from glycolysis, characterized by GK and PFK activities, to sustain the lipid synthesis. The

determination of TG and total cholesterol allowed distinguishing between the two options. Indeed, a modification in TG alone would suggest an effect of ascorbylperoxide on fatty acid synthesis whereas a similar modification of both lipids would suggest an impact on a common substrate. **Figure 1** shows that both TG (Figure 1A) and total cholesterol (Figure 1C) were increased in plasma of animals infused with ascorbylperoxide. The difference was significant with the infusion of 4  $\mu\text{mol/d}$  for plasma TG ( $F_{(1,17)}=9.1$ ) and of 1  $\mu\text{mol/d}$  for plasma total cholesterol ( $F_{(1,17)}=9.6$ ). No effect of ascorbylperoxide was observed in liver neither for TG ( $(F_{(1,17)}<1.9)$ ) (Figure 1B) nor for total cholesterol ( $(F_{(1,17)}<0.2)$ ) (Figure 1D).

ACC exists in its active and inactive (phosphorylated) form. The basal activity (non phosphorylated form) of ACC (**Figure 2A**) was negatively affected by infused ascorbylperoxide but only at the highest intake ( $F_{(1,18)}=12.3$ ). The lost of activity can be explained by a more phosphorylated state or a lost of enzyme. The first possibility was investigated by measuring the activity of the enzyme in presence of glutamate to provide the total activity. The ratio of basal on total activity indicates the level of activation of the enzyme. The total activity (Figure 2B) was lower in animals infused with at least 4  $\mu\text{mol/d}$  of ascorbylperoxide ( $F_{(1,18)}=7.4$ ) whereas the ratio of the activities (Figure 2C) was already affected with the lowest amount of ascorbylperoxide infused ( $F_{(1,18)}=9.2$ ), suggesting that ascorbylperoxide induces a de-phosphorylation of the enzyme. The activation of ACC by ascorbylperoxide has been already reported in our animal model (Knafo et al., 2005). On the other hand, the western blot analysis (Figure 2D) shows that the protein level of ACC was lower in animals infused with ascorbylperoxide ( $F_{(1,18)}=6.2$ ). Together, these data suggest that ascorbylperoxide has induced a more active (less phosphorylated) ACC but in a lower protein amount, whose resultant was a weaker activity.

The second option that can explain increased lipid production was a greater availability of substrate. AcetylCoA, which can derive from glycolysis, is a common substrate for the synthesis of TG and cholesterol. Glycokinase (GK) is the key enzyme in liver to favor the

glucose uptake by hepatocytes (Agius, 2008) whereas phosphofructokinase-1 (PFK) is the enzyme limiting the entry of glucose in glycolysis leading to formation of acetylCoA. The GK activity (**Figure 3A**) decreased ( $F_{(1,19)}=4.7$ ) in animals infused with the highest amount of ascorbylperoxide (7  $\mu\text{mol/d}$ ), whereas 4  $\mu\text{mol/d}$  were sufficient to induce a rise in PFK activity ( $F_{(1,19)}=9.1$ ) (Figure 3B). The protein amount of both enzymes did not vary between groups ( $F_{(1,19)}<0.6$ ) (Figures 3C & D). Plasma TG was not explained by PFK activity (linear correlation  $r^2 = 0.13$ ) whereas it correlated significantly and negatively with ACC activity ( $y = -7.6 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot x + 6.8 \text{ mM}$ ,  $r^2 = 0.37$ ,  $p<0.01$ ) (**Figure 4**).

The hepatic oxidative effect of ascorbylperoxide (**Figure 5**) has revealed with the highest amount infused (7 $\mu\text{mol/d}$ ). Indeed, in this group, isoprostane level (Figure 5B) as well as and the redox potential of glutathione (Figure 5A) was higher ( $F_{(1,19)}>6.7$ ). The more oxidized status of glutathione in this group was associated with a lower tissue concentration of GSH ( $F_{(1,19)}=5.6$ ) (**Table 2**) rather than a modification in GSSG level ( $F_{(1,19)}<3.8$ ).

**Figure 6** shows TG values (**A**) as well as the activities of PFK (**B**) and ACC (**C**) in function of urinary concentration of ascorbylperoxide. TG value and PFK activity increased positively in a logarithmic function with ascorbylperoxide (TG:  $y = 0.063\ln(x)+0.20 \text{ mM}$ ,  $r^2 = 0.69$ ,  $p<0.01$ ; PFK:  $y = 1.1\ln(x)+5.7 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.26$ ,  $p<0.05$ ). In contrast, the logarithmic relation between ACC activity and urinary ascorbylperoxide was negative ( $y = -0.7\ln(x)+5.4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.50$ ,  $p<0.01$ ).

## DISCUSSION

An important finding of the study is that infusion of increasing amount of ascorbylperoxide is associated with a rise of plasma triacylglycerol and cholesterol concentrations as well as a stimulation of PFK activity. In contrast to what was expected, these effects does not seem to be occurred through an oxidative stress caused by this peroxide. Indeed, in concentration range affecting TG and PFK, two markers of oxidative stress that are isoprostane and redox

potential of glutathione were not affected by the infusion of ascorbylperoxide. More surprising was the drop of ACC activity in function of infused ascorbylperoxide. This last effect supports the notion that ascorbylperoxide induces the production of TG by improving substrate availability deriving from glycolysis rather than by stimulation of enzymatic machinery of lipogenesis. This notion can explain the fact that levels of both TG and cholesterol were increased.

The opposite effect on PFK and ACC activities could be explained by multiple actions of ascorbylperoxyde such as on the allosteric modulation by different molecules or by an upstream common effect such as on insulin. This last possibility seems to better be appropriate since it is more probable that ascorbylperoxide acts on only one system. For instance, insulin is known to stimulate the PFK activity by phosphorylation (Muller et al, 1988) whereas it activates ACC by dephosphorylation (Witters et al. 1988) or by stimulating its gene transcription through SREBP1 (Tong, 2005). Hence, the insulin-mimic effect of ascorbylperoxide can explain our results on PFK and ACC activation (Figure 3C). The loss of activity and protein level of ACC in animals infused with ascorbylperoxide can be explained by a negative feed-back effect of newly synthesized fatty acids on the expression of SREBP1 (Field et al., 2002). This last suggestion is supported by the negative correlation between ACC activity and plasma TG (Figure 4). On the other hand, it is not excluded that ascorbylperoxide can perturb the clearance of plasma lipids; this possibility was not an aim of the present study. The relation between ascorbylperoxide, insulin and clearance should be investigated in a further study in which all constituents of parenteral nutrition could be present to mimic more closely the clinical situation.

The relation between infused ascorbylperoxide and its concentration in urine is strong (Table 1). The high ratio of the urinary concentration on the quantity infused suggests that infused ascorbylperoxide is easily eliminated in urine. The study of the relations (figure 6) between urinary concentration of ascorbylperoxide and plasma TG, hepatic activity of PFK and ACC suggests that an efficient threshold did not exist for this molecule. The fact that



ascorbylperoxide is detectable in urine of animals which were not infused with the molecule suggest an endogenous formation. That was also observed in our previous study (Knafo et al., 2005). The values of the endogenous threshold ( $0.8 \mu\text{mol/mg}$  creatinine) correspond to the inflexion point of the curves shown in Figure 6 (vertical dashed line). Therefore, a little addition of ascorbylperoxide could have metabolic consequences.

The premise of the study was to bring an explanation to the clinical observation done in premature infants that the absence of adequate photo-protection of parenteral nutrition was associated with a higher plasma TG compared to those receiving light-protected parenteral nutritive solution (Khashu et al., 2009). Since the light-exposure of parenteral nutritive solution favors the generation of ascorbylperoxide (Lavoie et al., 2004; Knafo et al., 2005), the present study suggests that the active agent coming from parenteral nutrition is the ascorbylperoxide, which induces a metabolic phenotype similar to an antenatal profile of the metabolism of glucose and lipids. Indeed, during the antenatal period, the activity of PFK is higher (Casado et al, 1996) and that of ACC is lower (Walther et al, 1995) than those after birth. The consequences to maintain such metabolism are unknown. However, because ascorbylperoxide derived from ascorbate, a vitamin largely available, further studies are needed to assess the biological or toxic role of this compound in human population.

## References

- Abnous K, Storey KB (2008) Skeletal muscle hexokinase: regulation in mammalian hibernation. *Mol Cell Biochem* **319**: 41-50.
- Agius L (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* **414**: 1-18.
- Casado M, Bosca L, Martin-Sanz P (1996) Multiple forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase are expressed in perinatal rat liver. *Am J Physiol* **270** : 244-250.
- Chessex P, Lavoie JC, Laborie S and Rouleau T (2001) Parenteral multivitamin supplementation induces oxidant as well as antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **32**:316-321.
- Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy E and Alvarez F (2002) Photooxidation of parenteral multivitamins induce hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* **52**: 958-963.
- Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A (1996) Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7225-7230.
- Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN (2002) Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J* **368**:855-864.
- Gaussin V, Hue L, Stalmans W, Bollen M (1996) Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg<sup>2+</sup> is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem J* **316**: 217-224.
- Gunn T, Reaman G, Outerbridge EW and Colle E (1978) Peripheral total parenteral nutrition for premature infants with the respiratory distress syndrome: a controlled study. *J Pediatr* **92**: 608-613.

- Hamer MJ, Dickson AJ (1987) Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment. *Biochem J* **245**: 35-39.
- Helbock HJ, Motchnik PA and Ames BN (1993) Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants. *Pediatrics* **91**: 83-88.
- Jiang, ZY, Woollard AC, Wolff SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* **26** : 853-856.
- Karadsheh NS, Uyeda K, Oliver RM (1977) Studies on structure of human erythrocyte phosphofructokinase. *J Biol Chem* **252**: 3515-3524.
- Khashu M, Harrison A, Lalari V, Lavoie JC, Chessex P (2009) Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of plasma glucose and triglyceride in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* **94**: F111-F115.
- Knafo L, Chessex P, Rouleau T, Lavoie JC (2005) Association between hydrogen peroxyde-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin Chem* **51**: 1462-1471.
- Laborie S, Lavoie J C and 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 JC and Chessex P (2000) Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light. *J Pediatr* **136**: 628-632.
- Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M and Chessex P (1997) Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* **99**: E61-E70.
- Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T, Spalinger M and Chessex P (2000) Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation. *Biochem Pharmacol* **60**: 1297-1303.
- Lavoie JC, Chessex P, Rouleau T, Migneault D and Comte B (2004) Light-induced by-products of vitamin C in multivitamin solutions. *Clin Chem* **50**: 135-140.

- Lavoie JC, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J, Chessex P (2008) Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radic Biol Med* **45**: 572-577.
- Li O, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P and Flavell RA (2003) Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* **302**: 1560-1563
- Muller A, Unthan-Fechner K, Probst I (1988) Activation of phosphofructokinase 2 by insulin in cultured hepatocytes without accompanying changes of effector levels or cAMP-stimulated protein kinase activity ratios. *Eur J Biochem* **176**: 415-420.
- Neuzil J, Darlow B, Inxder T, Sluls K, Winterbourn C and Stocker R (1995) Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient light and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feeding. *J Pediatr* **126**: 785-790.
- Rideau N, Berradi H, Skiba-Cassy S, Panserat S, Cailleau-Andouin E, Dupont J (2008) Induction of glucokinase in chicken liver by dietary carbohydrates. *Gen Comp Endocrinol* **158**: 173-177
- Ouadda AB, Levy E, Ziv E, Lalonde G, Sane AT, Delvin E, Elchebly M (2009) Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in *Psammomys obesus*. *Biosci Rep* **29**: 283-292.
- Schafer FQ and Buettner GR (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.
- Silvers KM, Sluis KB, Darlow BA, McGill F, Stocker R and Winterbourn C (2001) Limiting light- induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid. *Acta Paediatr* **90**: 242-249.
- Tong L (2005) Acetyl-Coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell mol Life Sci* **62**: 1784-1803.
- Turcot, V, Rouleau T, Tsopmo A, Germain N, Potvin L, Nuyt AM, Lavoie JC (2009) Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic Biol Med* **47**: 275-282.

Walther FJ, Batenburg JJ (1995) Gene expression of fatty acid synthesizing enzymes in fetal rat lung in prolonged pregnancy. *Biol Neonate* **68**: 128-134.

Witters LA, Watts TD, Daniels DL, Evans JL (1988) Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5473-5477.

Xu MZ, Zhang AZ, Li XR, Xu W, Shen LW (2004) Effects of vanadate on the activities of mice glucokinase and hexokinase. *J Zhejiang Univ Sci* **5**: 1245-1248.

### **<sup>1</sup>Footnote**

This work was supported by grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77637) whereas the first author was financially supported by Hôpital de la Tour (Meyrin, Switzerland).

**Table 1. Ascorbylperoxide**

Infused † (mmol / d)	Urine †† (mmol / mg creat.)	Urine †† (mmol / mL)	Urine / infused ††† (%)
-	0.5 ± 0.1	0.04 ± 0.01	-
1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.3	0.15 ± 0.03	53 ± 10
4.0 ± 0.1	3.2 ± 0.7	0.30 ± 0.01	82 ± 7
7.0 ± 0.2	6.7 ± 0.8	0.43 ± 0.05	87 ± 1

†: Ascorbylperoxide infused = mean of three days; ††: urine from last day; †††: ratio obtained after deduction of endogenous content (95% confidence value from group without infusion of ascorbylperoxide = 0.80 mmol/ mg creatinine or 54 mM). Urinary concentration of creatinine did not vary between groups ( $78 \pm 6$  mg/mL;  $F_{(1,19)} < 1.4$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n= 4-7).

**Table 2. Glutathione status**

	Ascorbylperoxide infused (mmol / d):			
	0	1.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	7.0 ± 0.2
GSH (nmo/mg prot)	35 ± 5	82 ± 23	33 ± 13	19 ± 8 *
GSSG (nmol/mg prot)	0.35 ± 0.03	1.02 ± 0.29 *	0.37 ± 0.10	0.26 ± 0.06
GSSG / total glutathione (%)	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.6	3.0 ± 0.9	3.5 ± 1.1

Hepatic GSH level was significantly lower in the 7 mmol/d group (\*:  $p < 0.05$ ), whereas GSSG level was higher in the 1.1 mmol/d group (\*:  $p < 0.05$ ). There was no statistic difference between groups for GSSG / total glutathione ( $2 \times \text{GSSG} / [\text{GSH} + 2 \times \text{GSSG}]$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n = 4-7).

Figure 1

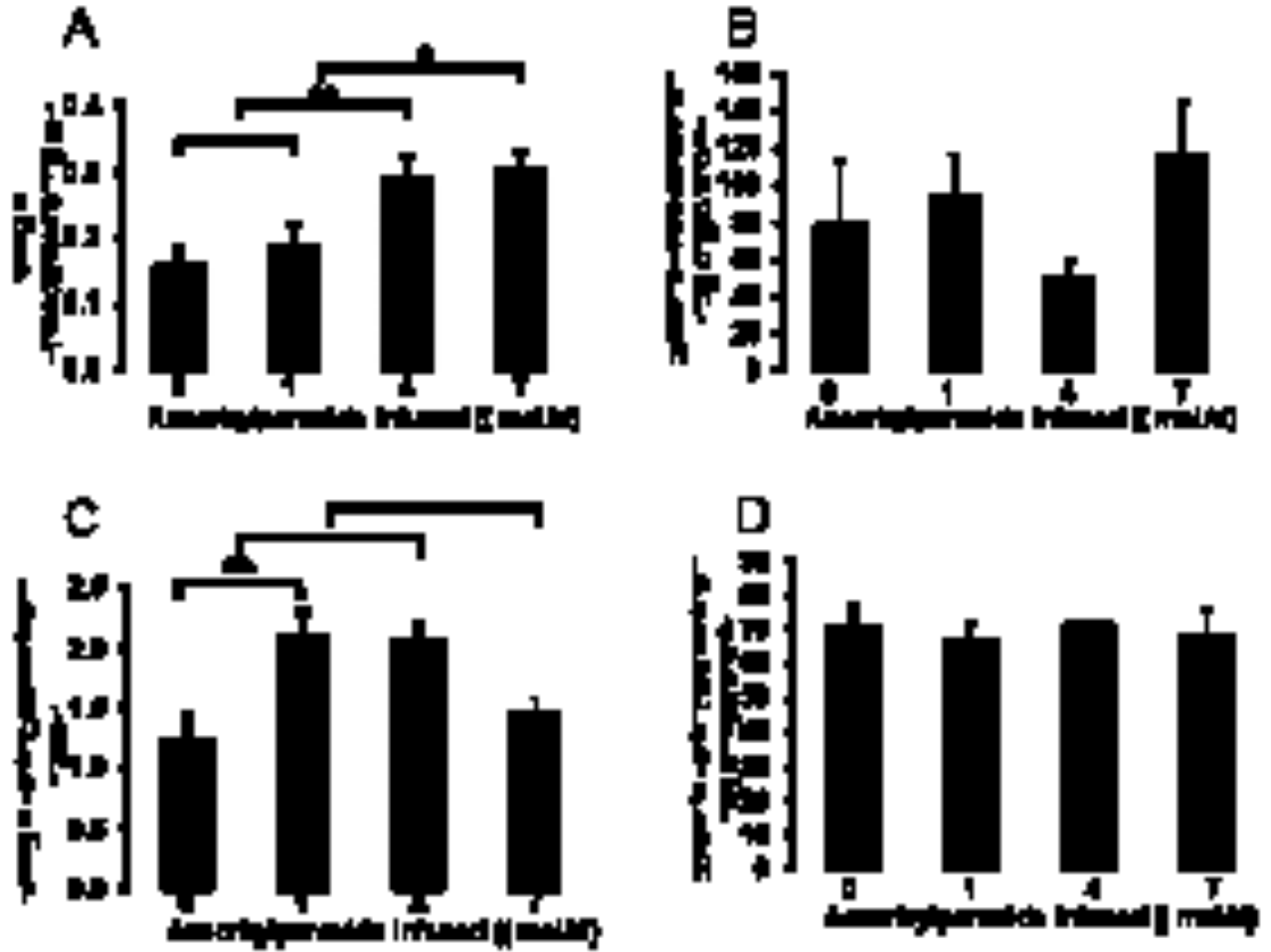


Figure 2

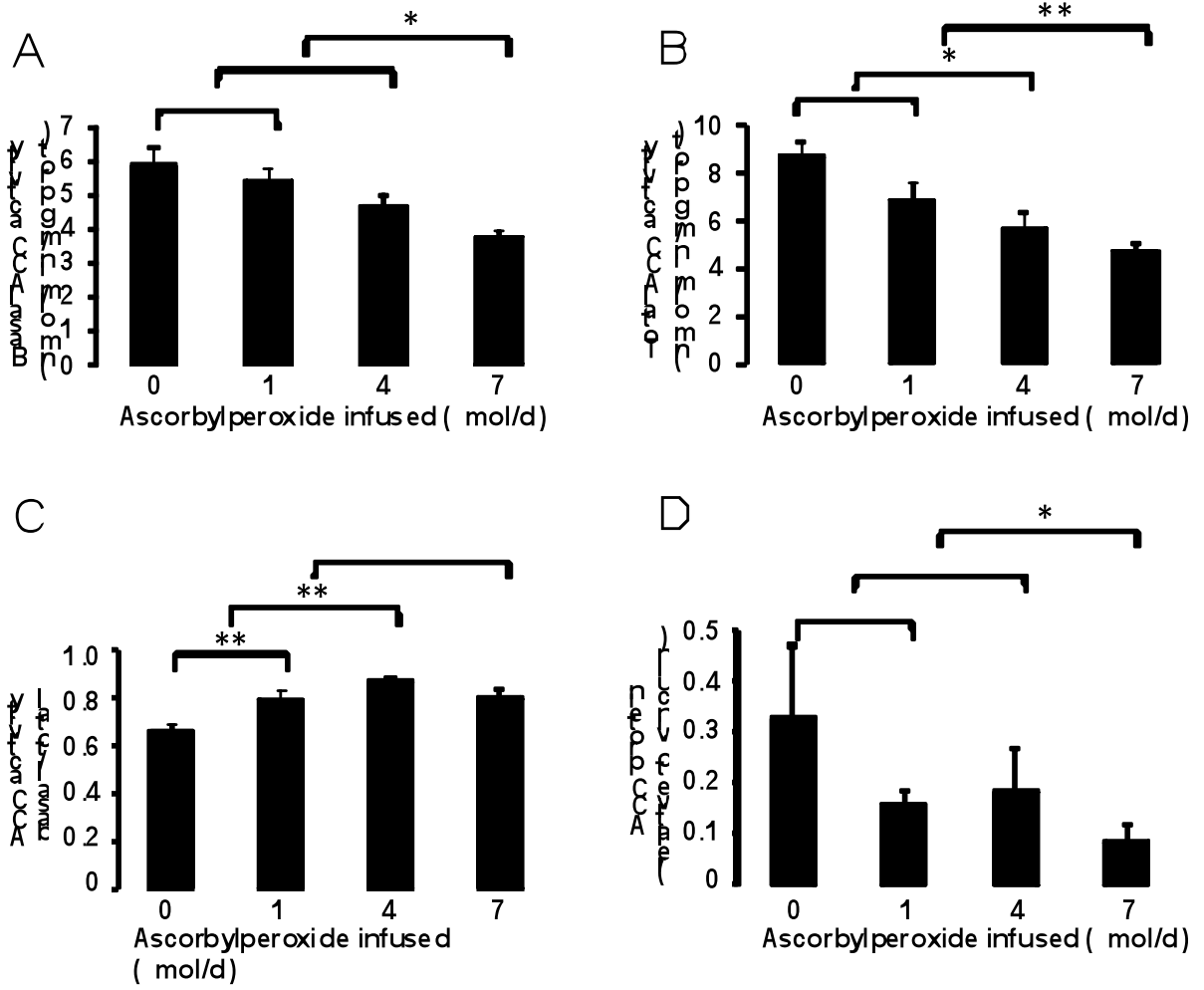




Figure 3

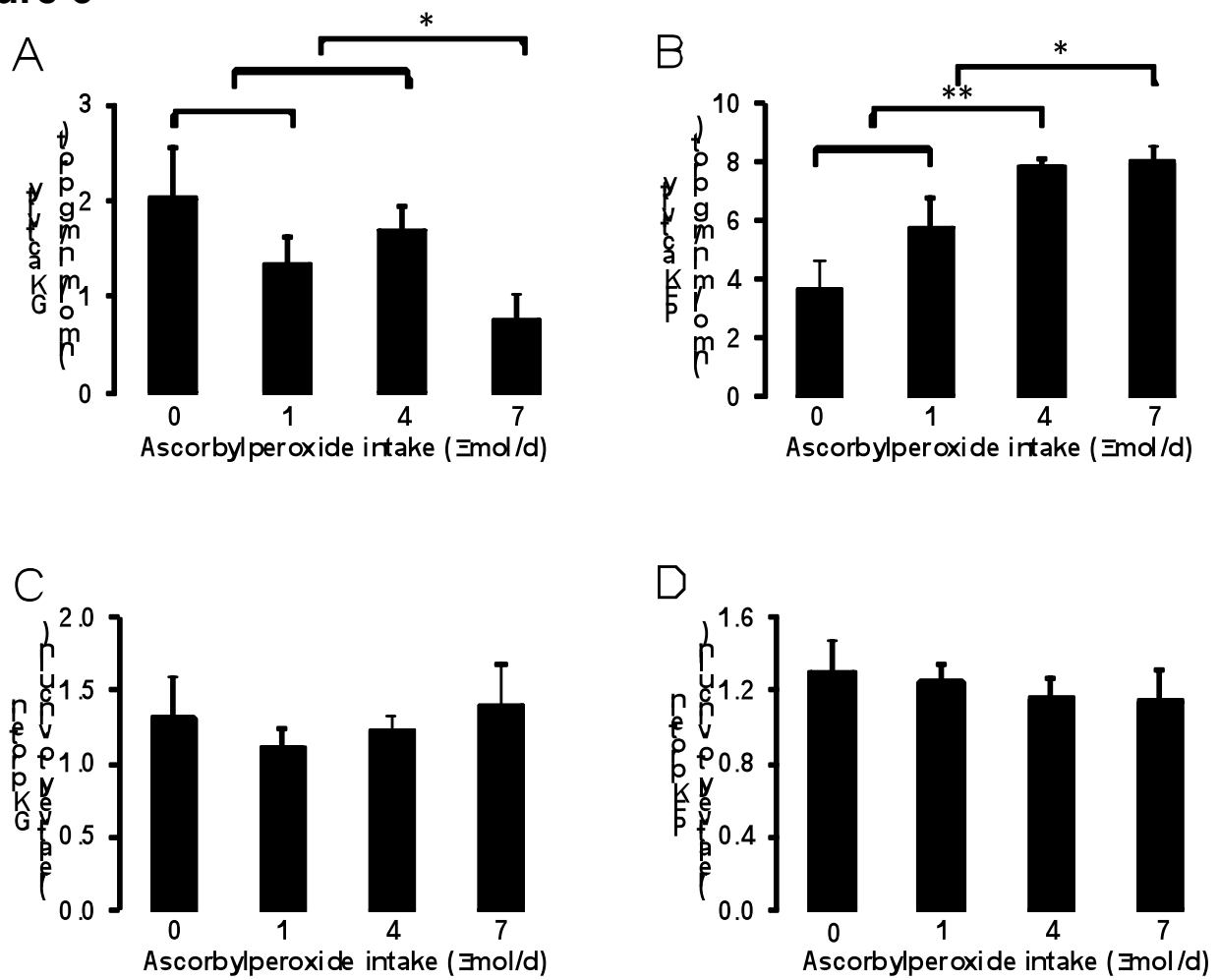


Figure 4

A

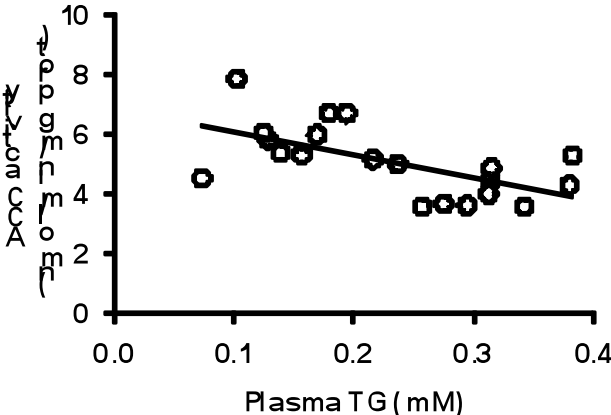


Figure 5

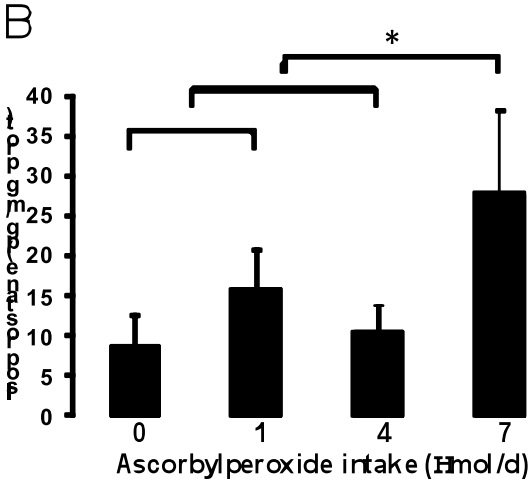
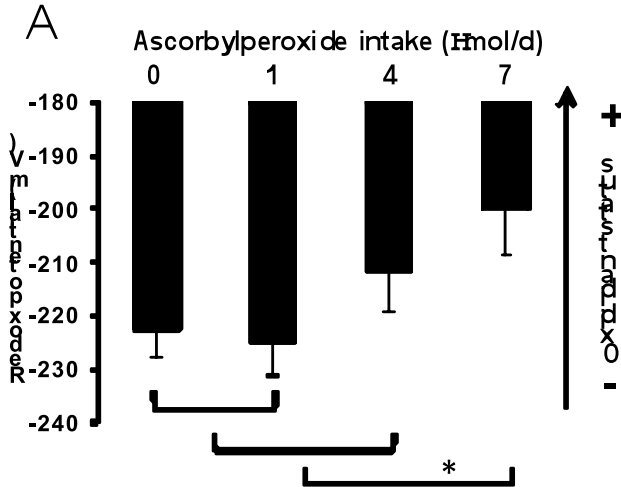
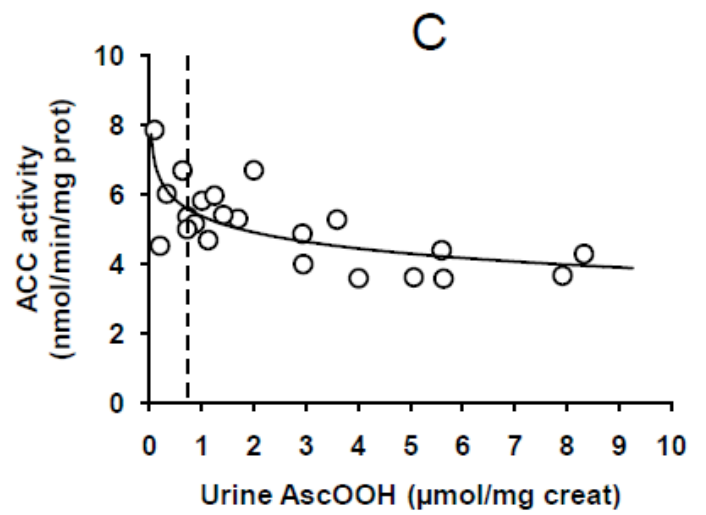
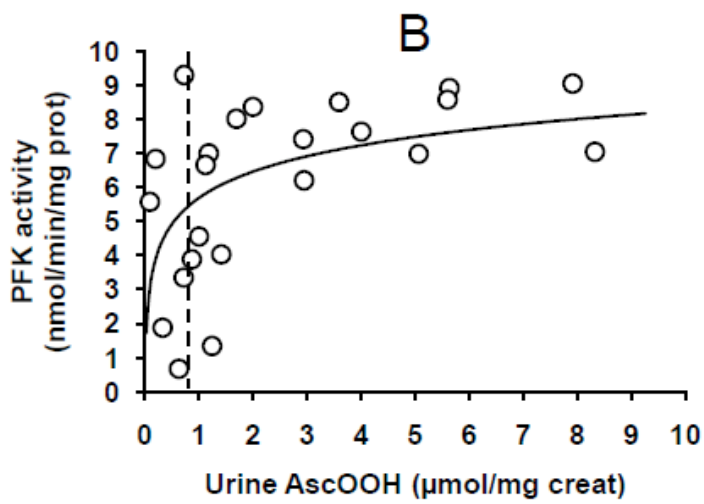
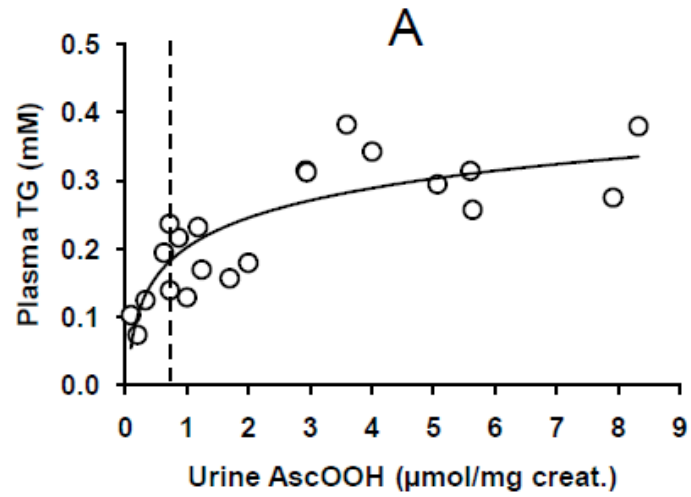


Figure 6



### Figure legends

**Figure 1. Plasma and hepatic triacylglycerol and cholesterol levels in function of infused amount of ascorbylperoxide.** Triacylglycerol concentration in plasma (A) was significantly higher in animals infused with at least 4  $\mu\text{mol}$  ascorbylperoxide per day whereas there was no difference in triacylglycerol between groups in liver (B). Total cholesterol concentration in plasma (C) was significantly higher in animals infused with at least 1  $\mu\text{mol}$  ascorbylperoxide per day whereas there was no difference in cholesterol between groups in liver (D). Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n= 4-7). \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ .

**Figure 2. Hepatic acetylCoA carboxylase in function of infused amount of ascorbylperoxide.** In function of increased amount of ascorbylperoxide infused, the basal (A) as well as the total activity (B) of acetylCoA carboxylase (ACC) decreased, the ratio of the basal on the total activity (C), reflecting the proportion of un-phosphorylated and active form of the enzyme, increased whereas the relative protein amount (D) decreased; the vinculin abundance did not vary statistically between groups. Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n= 4-7). \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ .

**Figure 3. Hepatic glucokinase and phosphofructokinase in function of infused amount of ascorbylperoxide.** Glucokinase (GK) activity (A) was lower in the group receiving the highest amount of ascorbylperoxide whereas the phosphofructokinase (PFK) activity (B) was higher in animals infused with at least 4  $\mu\text{mol/d}$  of ascorbylperoxide. The relative protein levels of GK (C) and PFK (D) as well as the reference protein vinculin were statistically similar between groups. Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. (n= 4-7). \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ .

**Figure 4. Hepatic acetylCoA carboxylase activity in function of the plasma triacylglycerol concentration.** The acetylCoA carboxylase activity was negatively correlated ( $r^2 = 0.37$ ,  $p < 0.01$ ) with plasma triacylglycerol concentration ( $y = -7.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot x + 6.8 \text{ mM}$ ).

**Figure 5. Hepatic markers of oxidative stress in function of infused amount of ascorbylperoxide.** Redox potential of glutathione (A) as well as the level of isoprostane (B) were higher in animals infused with the highest amount of ascorbylperoxide. Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 4-7$ ). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

**Figure 6. Plasma triacylglycerol concentration, hepatic phosphofructokinase and acetylCoA carboxylase activities in function of urinary triacylglycerol concentration.** Triacylglycerol concentration (TG) in plasma (A) and phosphofructokinase (PFK) activity (B) increased positively in a logarithmic function with ascorbylperoxide in urine (TG:  $y = 0.063 \ln(x) + 0.20 \text{ mM}$ ,  $r^2 = 0.69$ ,  $p < 0.01$ ; PFK:  $y = 1.1 \ln(x) + 5.7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.26$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast, the logarithmic relation between acetylCoA carboxylase (ACC) activity (C) and urinary ascorbylperoxide was negative ( $y = -0.7 \ln(x) + 5.4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.50$ ,  $p < 0.01$ ). Dashed line represents the calculated threshold limit of endogenous generation of ascorbylperoxyde in urine.

## 6. Autres résultats

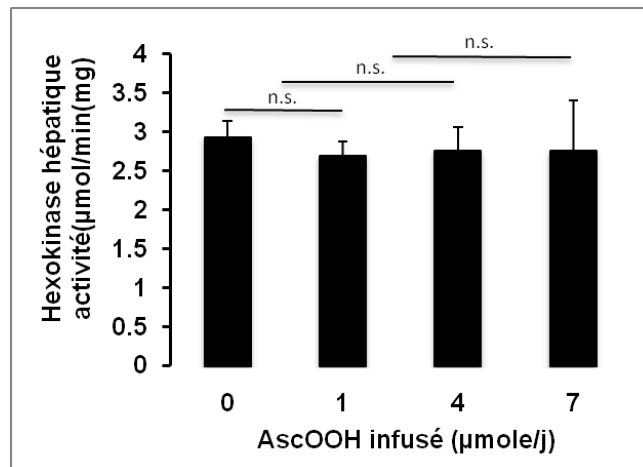
Tous les résultats obtenus au cours de ma maîtrise n'ont pas été utilisés lors de la rédaction de l'article scientifique. Néanmoins il est intéressant de les présenter dans ce mémoire.

### 6.1. Activité enzymatique de l'hexokinase

La GK est présente dans le foie uniquement et l'hexokinase (HK) dans tous les tissus mais en réalité l'HK est surtout un enzyme efficace dans les tissus périphériques. Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur la glycolyse, l'affinité de ces deux enzymes pour le glucose n'est pas la même. En effet la GK a une faible affinité pour le glucose ( $K_m$  10 mM) et n'est pas inhibée par son produit qu'est le glucose-6-P, ses caractéristiques sont donc idéales pour le foie, qui doit répondre à des flux importants de glucose. L'HK au contraire a une grande affinité pour le glucose, ce qui se traduit par une constante de Michaelis très basse ( $K_m$  0.4 mM) et elle est inhibée par le glucose-6-P. De plus l'HK peut phosphoryler n'importe quel hexose et lui permettre de rejoindre la glycolyse au niveau du fructose-6-P, contrairement à la GK qui ne phosphoryle que le glucose.

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre 4.3.3.1 pour la GK, nous mesurons l'activité enzymatique ( $n= 4-7$ ) à haute (100 mM) et à basse (5 mM) concentration de glucose. Les valeurs à basse concentration correspondent à l'HK.

Figure 5 : Activité de l'hexokinase hépatique en fonction de l'AscOOH infusé.



Les résultats ci-dessus montrent une grande stabilité de l'activité de l'HK, qui ne semble pas être influencée par les teneurs croissantes en AscOOH. Statistiquement il n'y a pas de différence entre les groupes ( $p < 0.05$ ).

Ces résultats peuvent s'expliquer par une sensibilité moindre aux peroxydes. En effet, certaines études [87] ont montré un rôle protecteur au niveau cellulaire de l'HK, entre autres contre les effets de l' $H_2O_2$ . En effet la fixation du N-terminal hydrophobique de l'enzyme aux mitochondries diminuerait la perméabilité de ces dernières aux  $H_2O_2$ .

L'AscOOH étant un peroxyde, il est par conséquent possible que l'HK ne soit pas affectée par ce dernier contrairement à la GK, qui montre une décroissance de son activité proportionnellement inverse à la quantité d'AscOOH infusée. La masse moléculaire de l'HK (isotype : I, II, III) est de 100 kDa, alors que celle de la GK est de 50 kDa seulement, illustrant une différence notable dans leur structure.

## **6.2.      Activité enzymatique de l'AMPK**

Globalement les résultats concernant l'AMPK ne sont pas statistiquement significatifs, à l'exception d'un résultat que nous verrons plus loin. Les résultats montrent une grande variation intra-groupe. De par l'effectif relativement restreint des groupes ( $n = 4-7$ ), la puissance statistique de nos analyses n'est pas suffisante pour démontrer un effet de l'infusion de l'AscOOH sur son activité, ce qui ne veut pas dire qu'il n'existe pas.

La variance constatée peut s'expliquer de plusieurs manières : d'abord, cette dernière diminue fortement lorsque nous faisons le rapport entre l'AMPK basale et l'AMPK activée, ce qui démontre que cette variance pourrait-être liée à la technique de dosage utilisée ou à une variation inter-animaux naturelle ou simplement être provoquée par une variable non contrôlable dont nous ignorons l'existence. Ces résultats ne semblent pas liés à une erreur de manipulation, car les variances sont constantes dans les deux expériences (AMPK basale et AMPK activée) comme vous pouvez le constater ci-dessous.

Une autre explication possible serait que dans les premiers jours de vie, de nombreuses modifications hormonales suivent la naissance [57], conduisant dans une brève période à



des changements majeurs au niveau du métabolisme énergétique. Sachant que Charles River (notre fournisseur d'animaux) considère qu'ils ont trois jours de vie qu'ils soient nés le matin tôt ou tard dans la journée. Cette écart pouvant être de plus de 12 heures et en connaissant la rapidité des processus en jeu, on est en droit de se demander quelle influence cette différence apparemment sans importance peut avoir dans un dosage comme celui de l'AMPK.

Figure 6 : Activité basale de l'AMPK hépatique en fonction de l'AscOOH infusé

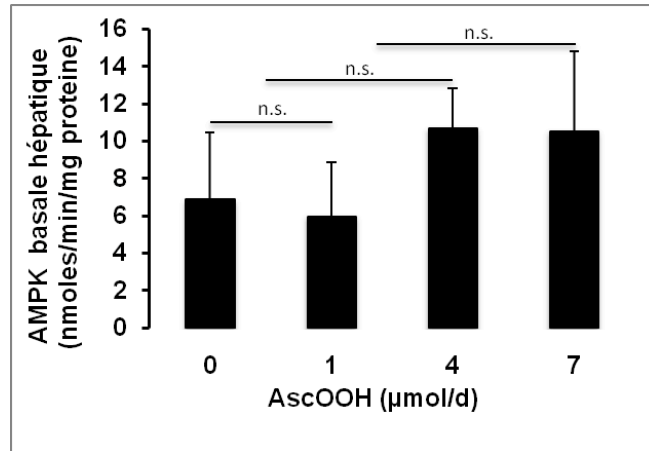
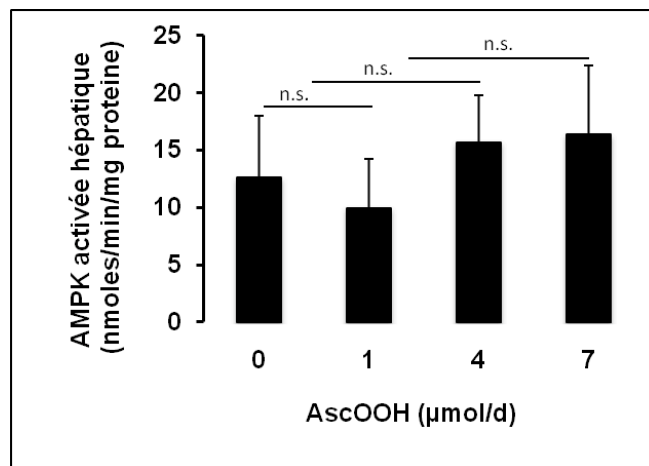
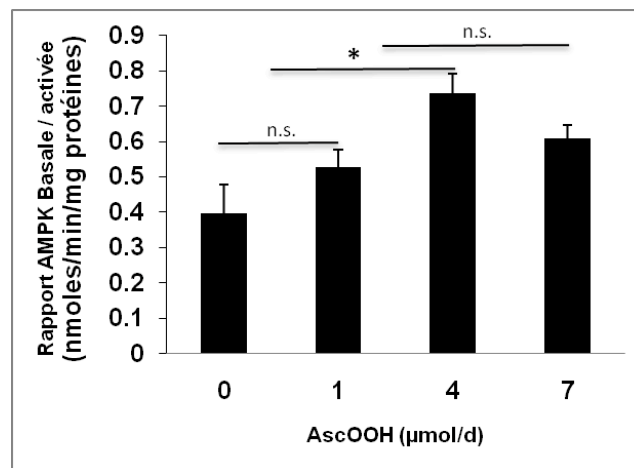


Figure 7 : Activité de l'AMPK hépatique activée en fonction de l'AscOOH infusé



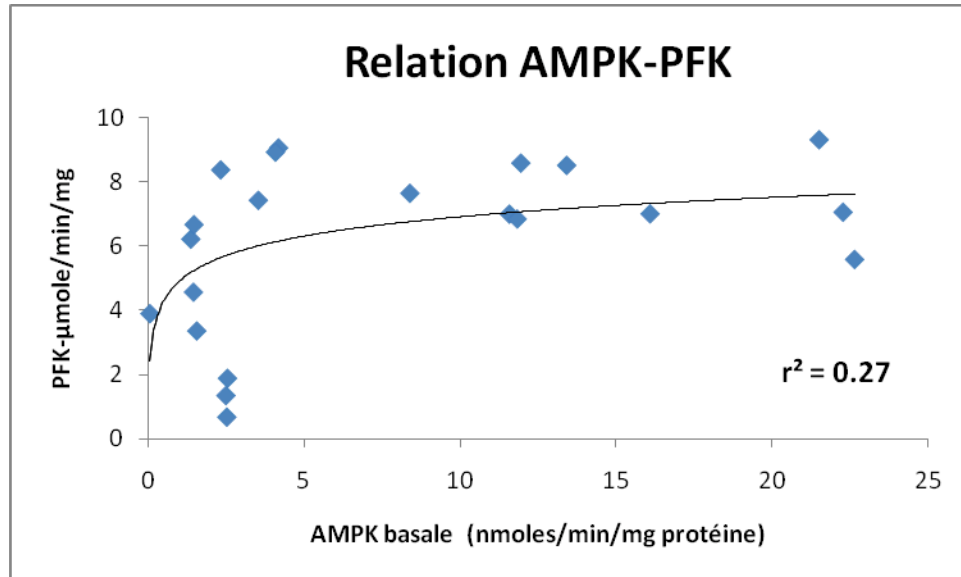
Lorsque l'on fait le rapport entre l'AMPK basale et l'AMPK activée, une différence statistiquement significative apparaît entre le groupe recevant 4  $\mu\text{moles/jour}$  d'AscOOH et les deux groupes précédents, respectivement le groupe témoin et le groupe recevant 1  $\mu\text{mole/jour}$  d'AscOOH. Cette différence disparaît avec le groupe recevant la plus forte concentration d'AscOOH soit 7  $\mu\text{moles/jour}$ .

Figure 8 : Rapport de l'activité de l'AMPK basale sur l'AMPK activée en fonction de l'AscOOH perfusé (\* :  $p < 0.05$ ).



En observant attentivement les 3 graphiques, l'on remarque qu'il y a une tendance à l'augmentation. Cette tendance de l'AMPK à augmenter en fonction des doses reçues d'AscOOH pourrait expliquer l'augmentation d'activité constatée de la PFK, car l'AMPK contrôle la phosphorylation de cette dernière [88]. Nous avons donc une hypothèse expliquant le mécanisme modulant l'activité d'une enzyme majeure de la glycolyse dans notre modèle expérimental. La figure ci-dessous montre une relation significative ( $p < 0.05$ ,  $r^2 : 0.27$ ) entre le l'AMPK basale et la PFK hépatique, appuyant ainsi l'hypothèse émise concernant son rôle dans le contrôle de cette enzyme.

Figure 9 : Relation entre l'activité de l'AMPK basale et l'activité de la PFK hépatique.



La distribution des points montre qu'assez vite l'activation de la PFK plafonne pour atteindre un plateau, ce qui indique une rapide saturation du mécanisme.

Il est important d'investiguer cette question en refaisant une étude comportant un nombre de sujets suffisant afin de démontrer l'implication de l'AMPK dans les effets physiologiques constatés de l'AscOOH.

## 7. Discussion

L'hypothèse générale ayant conduit à ce travail repose sur l'observation que l'infusion d'une NP néonatale exposée à la lumière entraîne une hausse des TG plasmatiques chez des cochons-d'inde d'une semaine de vie [45] ainsi que chez des prématurés humains [46] comparativement à ceux ayant reçu une NP protégée de la lumière. Chez les mêmes animaux, il a été noté que l'activité de l'ACC était plus élevée [45] et qu'une stéatose hépatique était présente [9]. Donc l'infusion de peroxydes via la NP semble activer la voie de la lipogenèse chez un modèle animal.

Afin de préciser les effets de l'AscOOH, une forme peroxydée de la vitamine C, nous nous sommes penchés sur la lipogenèse hépatique et ses principaux acteurs en commençant par la glycolyse hépatique. Car pour expliquer l'augmentation des TG nous avons trois voies possibles : une diminution de la clearance lipidique, une augmentation de la lipogenèse ou enfin une stimulation de la glycolyse hépatique aboutissant à une plus grande disponibilité de substrat pour la lipogenèse. C'est cette dernière voie qui nous semblait la plus probante, car François Côté a montré (données non publiées) que les cochon-d'indes infusés avec de l'AscOOH avaient en plus d'une élévation des triglycérides et du cholestérol circulant, une augmentation du pyruvate hépatique, un produit de la glycolyse cytoplasmique.

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises dans ce mémoire, l'infusion de doses croissantes d'AscOOH provoque une élévation proportionnelle des TG et du cholestérol plasmatique ainsi qu'une augmentation de l'activité de la PFK, une enzyme clé de la glycolyse.

Contrairement à notre hypothèse de départ, l'effet de l'AscOOH sur la glycolyse hépatique ne semble pas être causé par son pouvoir oxydant, bien que cette molécule soit un peroxyde. Pendant longtemps, nous avons émis l'hypothèse que son action sur la PFK était liée à ce pouvoir. En effet, il semble selon la littérature que les ponts disulfures de cette enzyme soient maintenus dans un milieu oxydé [66], ce qui entraîne une augmentation de son activité proportionnelle à l'oxydation de son milieu. Bien que cette hypothèse ne puisse

être démontrée dans cette étude, elle ne doit pas être écartée, car une nette tendance à l'oxydation (potentiel redox du glutathion) du milieu apparaît à mesure que les quantités d'AscOOH perfusées augmentent. Nous n'avons probablement pas la puissance statistique requise pour démontrer cette hypothèse.

En revanche, un deuxième marqueur de stress oxydant, le 8-isoprastane, n'est pas affecté par les niveaux d'AscOOH. Globalement les résultats concernant les marqueurs de stress oxydants soutiennent l'idée que ce mécanisme n'intervient pas à des doses d'AscOOH courantes en pratique clinique (1  $\mu$ mole/jour), mais uniquement lors de la perfusion de doses plus importantes d'AscOOH. En effet dans le groupe recevant 1  $\mu$ mole/jour de notre molécule, le taux de TG plasmatique augmente, alors qu'aucun marqueur de stress oxydant ne semble affecté. Ce n'est qu'à des doses plus importantes (4 et 7  $\mu$ moles/jour d'AscOOH) que le potentiel redox du glutathion est altéré.

Les résultats concernant la GK semblent indiquer qu'elle n'est pas impliquée dans l'hypertriglycéridémie associée à l'AscOOH. En effet, paradoxalement on constate aux plus hautes doses d'AscOOH une diminution significative de son activité (article – figure 3A), probablement provoquée par l'oxydation du milieu (article – figure 5A) qui pourrait affecter le fonctionnement de cette enzyme, en agissant sur ses groupements sulfhydryles [89]. L'effet hypertriglycéridémiant de l'AscOOH étant présent dès les plus faibles doses démontre bien que le  $k_m$  de la GK est suffisant pour pleinement alimenter la glycolyse cytoplasmique malgré une tendance à la baisse de son activité enzymatique proportionnellement inverse aux quantités d'AscOOH infusées.

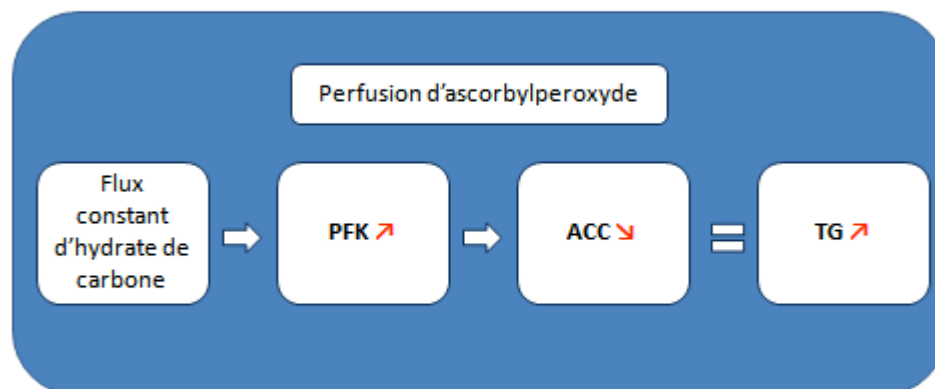
Les résultats concernant l'activité enzymatique de l'ACC indiquent une diminution significative de l'activité de cette dernière sous sa forme basale (la partie déphosphorylée au moment du sacrifice, donc la fraction active de l'ACC totale) ou de son activité totale (article - figure 2A et figure 2B). Cette diminution est proportionnelle à la quantité d'AscOOH infusée ce qui est surprenant compte tenu des résultats précédents [45]. Ce dernier résultat semble confirmer que l'effet de l'AscOOH sur l'augmentation de la lipogenèse est médiée par une élévation de la disponibilité de substrat provenant de la

glycolyse, plutôt que par une stimulation de la machinerie enzymatique de la lipogenèse. En effet, le ratio ACC basale/ACC totale (article – figure 2C) qui indique le niveau d'activation de l'enzyme augmente avec les quantités d'AscOOH infusées, alors que l'immuno-buvardage de l'ACC montre une diminution quantitative de l'enzyme (article – figure 2D). En résumé, il y a moins d'ACC mais elle est plus active.

Cette hypothèse expliquerait pourquoi nous avons assisté à une élévation concomitante des TG et du cholestérol plasmatique. Ce dernier semble avoir un accroissement en cloche (article – figure 1C), signe qu'éventuellement à haute dose l'AscOOH a un effet inhibiteur sur la voie de synthèse du cholestérol. L'absence, en revanche, d'effet de l'AscOOH sur les TG et le cholestérol hépatiques (article – figure 1B et figure 1D) nous suggère que l'accroissement de la production hépatique de ces derniers est compensée par une sécrétion probablement plus importante. Cependant, les effectifs réduits des groupes nous poussent à la prudence quand à ces conclusions.

Si nous devons résumer les principales étapes affectées par l'infusion de l'AscOOH, aboutissant à l'élévation du taux de triglycérides, nous pourrions le résumer comme ci-dessous.

Figure 10 : Résumé sommaire des effets de l'AscOOH sur la lipogenèse



**Légende** : ACC : acétyl-CoA Carboxylase; TG : triglycérides; PFK : phosphofruktokinase

Pour expliquer les effets contradictoires constatés de l'AscOOH sur la PFK et l'ACC (article – figure 2B et figure 3B), nous pouvons spéculer que l'AscOOH a une action ciblée

sur certaines familles d'enzymes régulatrices (protéines phosphatases, protéines kinases), il est par ailleurs fort probable qu'elle agisse sur une seule famille d'enzymes et non pas plusieurs à la fois. C'est-à-dire que si elle module les phosphatases elle n'agit pas sur les kinases.

La deuxième hypothèse pour expliquer nos résultats (article - figure 3C) est que l'AscOOH mime les effets de l'insuline (*insulin-like*). En effet l'insuline est connue pour stimuler l'activité des deux enzymes : la PFK en la phosphorylant [90] et l'ACC en la déphosphorylant [59, 91] ou encore en stimulant la transcription génique de l'ACC à travers le facteur de transcription SREBP1 [92]. Cette hypothèse reste valable pour l'ACC, malgré la diminution d'activité enzymatique proportionnellement inverse aux quantités infusées d'AscOOH et corrélée à une perte de protéines confirmée comme nous l'avons vu ci-dessus par immuno-buvardage (article – figure 2D). Ce résultat s'explique par la possible rétroaction négative des acides gras sur la synthèse de SREBP1 [93]. Cette supposition est soutenue par la corrélation négative trouvée entre l'activité de l'ACC et les TG plasmatiques (article - figure 4).

Ces résultats n'excluent pas que l'AscOOH puisse perturber la clearance des lipides plasmatiques ou que la  $\beta$ -oxydation soit altérée (pas de mesure du Malonyl-CoA). Notre dosage des TG plasmatiques mesure le glycérol, ce qui ne fournit qu'une information quantitative et non pas qualitative. Nous ne savons donc rien des lipoprotéines en circulation. En même temps, ce n'était pas le but de notre étude que de clarifier ce point.

Une grande inconnue demeure à propos du rôle exact de l'insuline dans les effets constatés de la perfusion d'AscOOH. Nous avons spéculé que notre peroxyde pouvait être impliqué dans les résultats contradictoires concernant l'ACC en mimant les effets de l'insuline. Mais quel est le rôle *per se* de l'insuline ? Il n'y a aucun moyen pour le moment de répondre à cette question, car il n'existe pas d'anticorps commerciaux contre l'insuline de cochons-d'inde. En calculant l'insulinémie à jeûn et l'indice HOMA (*HOMeostasis Model Assesement*, calcul d'homéostasie = insuline ( $\mu$ M) x glucose (mM)) nous aurions pu déterminer si la sensibilité à l'insuline était perturbée chez nos animaux. Nous savons que le

peroxyde d'hydrogène [94] agit sur les récepteurs de l'insuline en permettant à ces derniers d'être plus phosphorylés et d'émettre un meilleur signal, mais nous ne savons pas si l'AscOOH agit de la même façon.

La relation entre l'AscOOH, l'insuline et les lipides plasmatiques devra être investiguée dans de futures études comportant une nutrition parentérale complète, afin d'approcher les conditions cliniques standards.

D'un point de vue pharmacocinétique, notre molécule semble être facilement éliminée dans les urines, comme le montre la forte relation entre les concentrations urinaires et les quantités perfusées (article – table 1). Elle s'accumule donc peu ou pas dans les tissus. L'étude des relations (article – figure 6) entre la concentration urinaire d'AscOOH et la teneur plasmatique en TG, l'activité hépatique de la PFK et de l'ACC, suggère qu'il n'y a pas de seuil minimal d'efficacité. Dès les plus petites concentrations perfusées, elle semble agir. Il est par ailleurs possible que nous n'assistions pas aux mêmes phénomènes lorsque nous perfusions des basses ou des hautes concentrations d'AscOOH. A basse concentration, les effets seraient liés à un effet *insulin-like* et à plus haute concentration à son pouvoir oxydant. Nous avons également confirmé les résultats de Knafo [45] qui montrait, dans sa publication, qu'il existait une production endogène de cette molécule, car comme nous, les animaux de son groupe témoin avaient des seuils détectables d'AscOOH dans les urines. A l'aide des concentrations urinaires de notre groupe témoin, nous avons fixé la valeur du seuil endogène d'AscOOH à 0.8  $\mu$ mole/mg créatinine. Comme vous pouvez voir, ce seuil incarné par les lignes pointillées de la figure 6 (article), marque la limite d'inflexion des courbes. Passé ce seuil endogène, chaque augmentation des apports d'AscOOH aura un effet métabolique marqué.

Les résultats de cette étude animale, tout comme ceux d'une étude clinique récente [46], suggèrent que la molécule responsable de la dyslipidémie constatée chez les prématurés recevant une NP exposée à la lumière, comparé à ceux recevant une NP protégée de la lumière, est l'AscOOH.



Ce qui est surprenant, c'est qu'il semble que cette molécule maintienne un phénotype prénatal des métabolismes du glucose et des lipides. En effet, il est connu que l'activité de la PFK est plus haute [95] et celle de l'ACC plus basse [96] dans la période anténatale, exactement comme pour nos animaux recevant de l'AscOOH.

Nous ne savons pas si ce profil se maintient dans le temps et nous ne pouvons que spéculer sur ses effets potentiels à long terme. Les théories sur la programmation périnatale [97] et le rôle de la nutrition postnatale dans le développement de phénotypes particuliers [98, 99] nous renseignent sur un possible maintien de ce profil dans le temps. Il est possible que ce fardeau se rajoute à tous les autres déjà connus affectant le prématuré [18, 100].

Et puisque que l'AscOOH dérive de la vitamine C, il serait souhaitable dans une prochaine étude d'évaluer la présence de cette molécule dans des aliments courants et son impact dans la population. Théoriquement, il n'est pas impossible d'en retrouver des quantités suffisantes pour avoir un effet métabolique.

## 8. Conclusion

Ce travail a permis de mieux comprendre le rôle de l'AscOOH dans l'hypertriglycéridémie constaté chez le nouveau-né recevant une NP exposée à la lumière.

Il est évident, que cette étude n'est qu'une première étape, car nous ne connaissons qu'une petite facette des effets de l'AscOOH. Il serait utile d'étudier son impact sur le reste du métabolisme énergétique, mais également sur le développement ou le fonctionnement dans le temps d'organes sensibles aux composés peroxydés de la NP chez le nouveau-né tels que les poumons, les reins, la rétine par exemple [101].

Dans l'immédiat, il est important de sensibiliser les équipes soignantes au fardeau supplémentaire que représente pour ces enfants une NP exposée à lumière. Il faut les inciter à utiliser les moyens de protection parfois simples [31, 102] qui existent car l'exposition à la lumière de la nutrition intraveineuse génère en plus de l'AscOOH d'autres molécules préjudiciables à leur santé [13, 14, 27, 103, 104]. Il n'est pas utopique d'imaginer que l'AscOOH puisse servir de marqueur urinaire pour les cliniciens cherchant à vérifier le degré d'exposition à la lumière des poches de NP. A l'heure actuelle, aucun moyen simple n'existe.

Globalement, la recherche en nutrition clinique mérite plus d'attention et de moyens de la part des pouvoirs publics. C'est un domaine qui est, malheureusement encore de nos jours, partiellement délaissé pour d'obscures raisons. J'espère que ce travail contribuera dans le domaine de la nutrition néonatalogique à éveiller les consciences sur le formidable potentiel thérapeutique qu'elle représente pour les générations futures. La nutrition peut être plus qu'un simple support nutritionnel car, en améliorant la nutrition artificielle, nous pouvons prévenir l'apparition de séquelles durables et ainsi permettre à ces enfants d'atteindre leur plein potentiel.

## Bibliographie

1. Neu, J., *Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 629S-634.
2. Cooke, R.J. and N.D. Embleton, *Feeding issues in preterm infants*. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed., 2000. **83**(3): p. F215-218.
3. McGuire, W., G. Henderson, and P.W. Fowlie, *Feeding the preterm infant*. BMJ, 2004. **329**(7476): p. 1227-1230.
4. Driscoll, D.F., et al., *Pharmaceutical and clinical aspects of parenteral lipid emulsions in neonatology*. Clin Nutr, 2008. **27**(4): p. 497-503.
5. Valentine, C.J. and T.D. Puthoff, *Enhancing parenteral nutrition therapy for the neonate*. Nutr Clin Pract. 2007 Apr;22(2):183-93., 2007.
6. Chessex, P., et al., *In preterm neonates, is the risk of developing bronchopulmonary dysplasia influenced by the failure to protect total parenteral nutrition from exposure to ambient light?* J Pediatr, 2007. **151**(2): p. 213-4.
7. Lavoie, J.-C., T. Rouleau, and P. Chessex, *Interaction between Ascorbate and Light-Exposed Riboflavin Induces Lung Remodeling*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(2): p. 634-639.
8. Lavoie, J.C., et al., *Photoprotection prevents TPN-induced lung procollagen mRNA in newborn guinea pigs*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 512-20.
9. Chessex, P., et al., *Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition*. Pediatr Res, 2002. **52**(6): p. 958-63.
10. Lavoie, J.-C., et al., *Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation*. Biochemical Pharmacology, 2000. **60**(9): p. 1297-1303.
11. Romeo, C., et al., *Neonatal oxidative liver metabolism: Effects of hydrogen peroxide, a putative mediator of septic damage*. Journal of Pediatric Surgery, 1999. **34**(7): p. 1107-1111.
12. Basu, R., et al., *Free radical formation in infants: The effect of critical illness, parenteral nutrition, and enteral feeding*. Journal of Pediatric Surgery, 1999. **34**(7): p. 1091-1095.

13. Neuzil, J., et al., *Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feeding*. J Pediatr, 1995. **126**(5 Pt 1): p. 785-90.
14. Helbock, H.J., P.A. Motchnik, and B.N. Ames, *Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants*. Pediatrics, 1993. **91**(1): p. 83-7.
15. Luo, Z.C., et al., *Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress?* Med Hypotheses, 2006. **66**(1): p. 38-44.
16. Lavoie, J.-C., et al., *Admixture of a Multivitamin Preparation to Parenteral Nutrition: The Major Contributor to In Vitro Generation of Peroxides*. Pediatrics, 1997. **99**(3): p. e6-.
17. Robert, L.G., *Factors Influencing Perinatal Outcomes*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. **1038**(Understanding and Optimizing Human Development: From Cells to Patients to Populations): p. 227-234.
18. Williamson, D.M., et al., *Current Research in Preterm Birth*. Journal of Women's Health, 2008. **17**(10): p. 1545-1549.
19. Goldenberg, R.L., et al., *Epidemiology and causes of preterm birth*. The Lancet, 2007. **371**(9606): p. 75-84.
20. McGuire, W., G. Henderson, and P.W. Fowlie, *Feeding the preterm infant*. BMJ, 2004. **329**(7476): p. 1227-30.
21. Saugstad, O.D., *Oxidative stress in newborn-a 30- year perspective*. Biol Neonate, 2005. **88**: p. 228-36.
22. Thureen, P.J. and W.W. Hay, *Early aggressive nutrition in preterm infants*. Seminars in Neonatology, 2001. **6**(5): p. 403-415.
23. Koletzko, B., et al., *1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41 Suppl 2**: p. S1-87.
24. Picaud, J.-C., *Dénutrition périnatale : prise en charge nutritionnelle spécifique du nouveau-né*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2005. **19**(4): p. 238-243.
25. Lapillonne, A., et al., *Parenteral Nutrition Objectives for Very Low Birth Weight Infants: Results of a National Survey*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009.

26. Jalabert, A., et al., *Évaluation des phénomènes de peroxydation lipidique dans les solutés de nutrition parentérale administrés aux enfants prématurés*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2006. **20**(2): p. 61-67.
27. Allwood, M.C. and M.C.J. Kearney, *Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures*. Nutrition, 1998. **14**(9): p. 697-706.
28. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
29. Poli, G., F. Biasi, and G. Leonarduzzi, *4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(1-2): p. 67-71.
30. Chessex, P., et al., *Photoprotection of solutions of parenteral nutrition decreases the infused load as well as the urinary excretion of peroxides in premature infants*. Semin Perinatol, 2001. **25**(2): p. 55-9.
31. Baird, L.L., *Protecting TPN and lipid infusions from light: reducing hydroperoxides in NICU patients*. Neonatal Netw, 2001. **20**(2): p. 17-22.
32. Laborie, S., et al., *Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(4): p. 440-445.
33. Laborie, S., J.C. Lavoie, and P. Chessex, *Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light*. J Pediatr, 2000. **136**(5): p. 628-32.
34. Thureen, P.J., et al., *Effect of Low versus High Intravenous Amino Acid Intake on Very Low Birth Weight Infants in the Early Neonatal Period*. Pediatric Research, 2003. **53**(1): p. 24-32.
35. Dupertuis, Y.M., et al., *Assessment of Ascorbic Acid Stability in Different Multilayered Parenteral Nutrition Bags: Critical Influence of the Bag Wall Material*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2005. **29**(2): p. 125-130.
36. Driscoll, D.F., *Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(3): p. 297-303.
37. Dupertuis, Y.M., et al., *Physical characteristics of total parenteral nutrition bags significantly affect the stability of vitamins C and B1: a controlled prospective study*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2002. **26**(5): p. 310-316.

38. Krohn, K. and B. Koletzko, *Parenteral lipid emulsions in paediatrics*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(3): p. 319-23.
39. Halliwell, B., *Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?* Free Radic Res, 1996. **25**(5): p. 439-54.
40. Rumsey, S.C. and M. Levine, *Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1998. **9**(3): p. 116-130.
41. Lavoie, J.-C., et al., *Light-Induced Byproducts of Vitamin C in Multivitamin Solutions*. Clin Chem, 2004. **50**(1): p. 135-140.
42. Kim, H., et al., *Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an ESR study*. Photochem Photobiol, 1993. **57**(5): p. 777-84.
43. Laborie, S., J.C. Lavoie, and P. Chessex, *Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation*. Pediatr Res, 1998. **43**(5): p. 601-6.
44. Laborie, S., et al., *Multivitamin solutions for enteral supplementation: a source of peroxides*. Nutrition, 2002. **18**(6): p. 470-473.
45. Knafo, L., et al., *Association between Hydrogen Peroxide-Dependent Byproducts of Ascorbic Acid and Increased Hepatic Acetyl-CoA Carboxylase Activity*. Clin Chem, 2005. **51**(8): p. 1462-1471.
46. Khashu, M., et al., *Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of blood glucose and triglyceride levels in preterm neonates*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2009. **94**(2): p. F111-5.
47. Lavoie, J.C., et al., *Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 572-7; discussion 570-1.
48. Lavoie, J.-C., et al., *Effect of coadministration of parenteral multivitamins with lipid emulsion on lung remodeling in an animal model of total parenteral nutrition*. Pediatric Pulmonology, 2005. **40**(1): p. 53-56.
49. Lavoie, J.-C. and P. Chessex, *Gender and Maturation Affect Glutathione Status in Human Neonatal Tissues*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. **23**(4): p. 648-657.
50. Bassiouny, M.R., et al., *A randomized controlled trial on parenteral nutrition, oxidative stress, and chronic lung diseases in preterm infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. **48**(3): p. 363-9.

51. Vanhaesebrouck, S., et al., *Influence of duration of parenteral nutrition on retinopathy of prematurity*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(2): p. F170.
52. Droge, W., *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Physiol. Rev., 2002. **82**(1): p. 47-95.
53. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-1028.
54. Pincemail, J., et al., *Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante* *Physiological action of antioxidant defences*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2002. **16**(4): p. 233-239.
55. Berger, M.M., *Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2006. **20**(1): p. 48-53.
56. Beauvieux, M., H. Gin, and E. Peuchant, *Le stress oxydant et ses marqueurs biologiques*. Cahier de la Nutrition et de la Diététique, 2002. **37**(1): p. 45-51.
57. Mitanchez, D., *Ontogenèse de la régulation glycémique et conséquences pour la prise en charge du nouveau-né*. Archives de Pédiatrie, 2008. **15**(1): p. 64-74.
58. Murray, G., Mayes, Rowell, *Biochimie de Harper, 25ème édition américaine, revue et mise à jour*. 2002.
59. Brownsey, R.W., et al., *Regulation of acetyl-CoA carboxylase*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 2): p. 223-7.
60. Hadad, S., et al., *Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**(1): p. 307.
61. Horman, S., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis*. Curr Biol, 2002. **12**(16): p. 1419 - 1423.
62. Hardie, D.G., S.A. Hawley, and J.W. Scott, *AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 7 - 15.
63. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 113 - 120.
64. Agius, L., *Hexokinase and glucokinase binding in permeabilized guinea-pig hepatocytes*. Biochem J, 1994. **303** ( Pt 3): p. 841-6.

65. Hue, L., et al., *Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(9): p. 1091-7.
66. Ogasawara, Y., et al., *Modification of liver cytosol enzyme activities promoted in vitro by reduced sulfur species generated from cystine with gamma-cystathionase*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1334**(1): p. 33-43.
67. Tan, M.J. and R.W. Cooke, *Improving head growth in very preterm infants--a randomised controlled trial I: neonatal outcomes*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(5): p. F337-41.
68. Fernandez, M.L. and J.S. Volek, *Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation*. Nutr Metab (Lond), 2006. **3**: p. 17.
69. Fernandez, M.L., *Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism*. J Nutr, 2001. **131**(1): p. 10-20.
70. Turcot, V., et al., *Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(3): p. 275-82.
71. Puiman, P. and B. Stoll, *Animal models to study neonatal nutrition in humans*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. **11**(5): p. 601-6.
72. Lavoie, J.-C., et al., *Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs*. Clinical Nutrition, 2007. **26**(3): p. 341-347.
73. Chessex, P., et al., *The mode of delivery of parenteral multivitamins influences nutrient handling in an animal model of total parenteral nutrition*. Clinical Nutrition, 2005. **24**(2): p. 281-287.
74. Chessex, P., et al., *Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(3): p. 316-21.
75. Makinde, A.O., J. Gamble, and G.D. Lopaschuk, *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, 1997. **80**(4): p. 482-9.
76. Kudo, N., et al., *High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17513-20.



77. Hardie, D.G., *Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1123**(3): p. 231-8.
78. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
79. Hamer, M.J. and A.J. Dickson, *Developmental changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase-1 activity in the transition of chicks from embryonic to neonatal nutritional environment*. Biochem J, 1987. **245**(1): p. 35-9.
80. Karadsheh, N.S., K. Uyeda, and R.M. Oliver, *Studies on structure of human erythrocyte phosphofructokinase*. J Biol Chem, 1977. **252**(10): p. 3515-24.
81. Rideau, N., et al., *Induction of glucokinase in chicken liver by dietary carbohydrates*. Gen Comp Endocrinol, 2008. **158**(2): p. 173-7.
82. Abnous, K. and K.B. Storey, *Skeletal muscle hexokinase: regulation in mammalian hibernation*. Mol Cell Biochem, 2008. **319**(1-2): p. 41-50.
83. Xu, M.Z., et al., *Effects of vanadate on the activities of mice glucokinase and hexokinase*. J Zhejiang Univ Sci, 2004. **5**(10): p. 1245-8.
84. Ferre, T., et al., *Correction of diabetic alterations by glucokinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7225-30.
85. Lavoie, J.C., et al., *Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41**(1): p. 108-14.
86. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
87. Sun, L., et al., *Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(3): p. 1007-17.
88. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1247 - 1255.
89. Tiedge, M., T. Richter, and S. Lenzen, *Importance of Cysteine Residues for the Stability and Catalytic Activity of Human Pancreatic Beta Cell Glucokinase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **375**(2): p. 251-260.

90. Muller, A., K. Unthan-Fechner, and I. Probst, *Activation of phosphofructokinase 2 by insulin in cultured hepatocytes without accompanying changes of effector levels or cAMP-stimulated protein kinase activity ratios*. Eur J Biochem, 1988. **176**(2): p. 415-20.
91. Witters, L.A., et al., *Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5473-7.
92. Tong, L., *Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(16): p. 1784-803.
93. Field, F.J., et al., *Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 3): p. 855-64.
94. Gardner, C.D., et al., *Hydrogen Peroxide Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells*. Experimental Biology and Medicine, 2003. **228**(7): p. 836-842.
95. Casado, M., L. Bosca, and P. Martin-Sanz, *Multiple forms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase are expressed in perinatal rat liver*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. E244-50.
96. Walther, F.J. and J.J. Batenburg, *Gene expression of fatty acid synthesizing enzymes in fetal rat lung in prolonged pregnancy*. Biol Neonate, 1995. **68**(2): p. 128-34.
97. McMillen, I.C. and J.S. Robinson, *Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming*. Physiol. Rev., 2005. **85**(2): p. 571-633.
98. Neu, J., N. Hauser, and M. Douglas-Escobar, *Postnatal nutrition and adult health programming*. Semin Fetal Neonatal Med, 2007. **12**(1): p. 78-86.
99. Lucas, A., *Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant*. J Perinatol, 2005. **25 Suppl 2**: p. S2-6.
100. Sperling, M.A., *Prematurity--a window of opportunity?* N Engl J Med, 2004. **351**(21): p. 2229-31.
101. Saigal, S. and L.W. Doyle, *An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood*. The Lancet, 2008. **371**(9608): p. 261-269.
102. Laborie, S., et al., *Protecting Solutions of Parenteral Nutrition From Peroxidation*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(2): p. 104-108.

103. Silvers, K.M., et al., *Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid*. Acta Paediatr, 2001. **90**(3): p. 242-9.
104. Steger, P.J.K. and S.F. Muhlebach, *Lipid Peroxidation of Intravenous Lipid Emulsions and All-in-One Admixtures in Total Parenteral Nutrition Bags: The Influence of Trace Elements*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2000. **24**(1): p. 37-41.