

Université de Montréal

**Impact de l'ajout de glutathion à la nutrition parentérale sur la
synthèse protéique chez le cochon d'Inde**

par Guillaume Morin

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade
de Maîtrise ès sciences (M. Sc.) en nutrition

Décembre 2018

© Guillaume Morin, 2018

Résumé

La nutrition parentérale (NP) est essentielle pour des enfants ayant des troubles intestinaux sévères. Toutefois, elle est associée à des effets secondaires importants. Les peroxydes contaminants la NP limitent l'utilisation de la méthionine comme précurseur de cystéine. Une déficience en cystéine est suggérée par un niveau de glutathion abaissé, limitant la détoxification des peroxydes, et contribuant davantage au stress oxydant. Hypothèse : La déficience en cystéine induite par la NP conduit à une synthèse protéique sous-optimale, particulièrement chez des enfants en croissance. Objectif : Démontrer chez l'animal qu'une supplémentation de la NP en glutathion (GSSG) en tant que procystéine, facilite la synthèse protéique et réduit le stress oxydant. Méthodologie : Des cochons d'Inde d'un mois de vie étaient nourris exclusivement par NP±GSSG via un cathéter jugulaire. Un groupe d'animaux nourris avec de la nourriture régulière servit de témoins. Au troisième jour de NP, de la leucine tritiée fut infusée pour évaluer la synthèse protéique. Au cinquième jour, l'hémoglobine, l'urée, le glutathion dans différents organes et l'incorporation protéique au muscle ont été déterminés. Résultats : L'incorporation protéique de radioactivité était de 57% plus élevée chez les NP+GSSG ($p < 0,05$). La concentration réduite en protéines plasmatiques chez le groupe NP ($p < 0,01$) fut élevée au niveau des témoins par l'ajout de GSSG. La présence de GSSG dans la NP a prévenu l'augmentation des marqueurs de stress oxydant observée chez le groupe NP ($p < 0,01$). Conclusion : Enrichir la NP en glutathion pour prévenir une déficience en cystéine représente une méthode simple pour maintenir la synthèse protéique et réduire le stress oxydant chez les individus en croissance. Mots-clés : nutrition parentérale, glutathion, stress oxydant, synthèse protéique, peroxyde, pédiatrie et cachexie.

Abstract

Parenteral nutrition (PN) is essential for children with severe intestinal disorders. However, this mode of nutrition is associated with significant side effects. Peroxides contaminating PN limit the use of methionine as precursor of cysteine. Cysteine deficiency is suggested by a lowered level of glutathione, limiting the detoxification of peroxides, contributing even more to oxidative stress. Hypothesis: PN-induced cysteine deficiency leads to suboptimal protein synthesis, especially in growing children. Objective: To demonstrate in an animal model of PN, that glutathione supplementation (GSSG), used as pro-cysteine, facilitates protein synthesis and reduces oxidative stress. Methodology: One-month-old Guinea pigs were exclusively fed by PN via a jugular catheter. A group of animals fed regular food served as controls. On the third day of PN, tritiated leucine was infused to evaluate protein synthesis. On the fifth day, haemoglobin, urea, glutathione in different organs and protein incorporation into the gastrocnemius muscle were determined. Results: Muscle protein incorporation of tritiated leucine was 57% higher in animals with PN + GSSG ($p < 0.05$). The reduced plasma protein concentration in the PN group ($p < 0.01$) was back to the controls by the addition of GSSG. The presence of GSSG in PN prevented the increase of oxidative stress markers observed in the PN group ($p < 0.01$). Conclusion: In a growing individual, enriching PN with glutathione is a simple way to maintain protein synthesis and reduce oxidative stress by impeding cysteine deficiency.

Keywords: parenteral nutrition, glutathione, oxidative stress, protein synthesis, peroxide, pediatrics and cachexia.

Table des matières

Résumé	i.
Abstract	ii.
Table des matières	iii.
Liste des tableaux	vi.
Liste des figures	vii.
Liste des abréviations	ix.
Remerciements	xii.
Avant-propos	xiii.
Introduction	1
1. La nutrition parentérale	1
1.1. Évolution de la nutrition parentérale chez l'enfant	2
1.2. Technologie et voie d'administration	2
1.3. Composition en macronutriments	3
2. Effets secondaires de la nutrition parentérale	8
2.1. Désordres métaboliques et complications	8
2.2. Stress oxydant et nutrition parentérale	10
2.3. Impact des peroxydes sur la synthèse protéique	10
3. Défense antioxydante contre les peroxydes	13

3.1. Glutathion	13
3.2. Exportation et importation	16
3.3. Impact d'une déficience en cystéine	17
Hypothèse et objectifs de l'étude	18
Méthodologie	19
1. Préliminaires de l'étude	19
1.1. Établissement d'une nutrition parentérale chez un modèle animal	19
1.2. Précédent modèle animal du laboratoire d'accueil	19
1.3. Nouveau modèle animal	21
1.4. Choix de la diète	22
1.5. Pilote de l'étude	24
1.5.1. Préparation de la chirurgie	25
1.5.2. Protocole proposé	27
1.5.3. Préparation de l'environnement	29
1.5.4. Préparation de la nutrition parentérale	31
1.6. Protocole final de l'étude	32
2. Méthodes présentées dans le manuscrit	37
2.1. Dosage des peroxydes en solution parentérale par le FOX	37
2.2. Dosage du GSH/GSSG par électrophorèse capillaire	37
2.3. Dosage enzymatique du glutathion total	39
2.4. Dosage des protéines totales	40
2.5. Dosage de radioactivité dans la fraction protéique	41
2.6. Dosage de l'hémoglobine	42
2.7. Dosage de l'urée	43

3. Analyses statistiques	44
Résultats	45
1. Modèle expérimental	45
2. Manuscrit prêt à être soumis à : <i>The Journal of Nutrition</i>	50
3. Résultats supplémentaires	76
Discussion	81
1. Effet systémique de la supplémentation en GSSG	81
2. Forces et limites du projet	85
Conclusion	88
Bibliographie	89

Liste des tableaux

Tableau I.	Concentration des acides aminés contenus dans les préparations d'acides aminés commerciales	7
Tableau II.	Caractéristiques des diètes parentérales du laboratoire et de la nourriture entérale régulière pour cochon d'Inde.	24
Tableau III.	Évolution du poids des animaux à l'étude en plus du débit et de l'apport calorique au terme de la nutrition parentérale.	49

Liste des figures

Figure 1.	Voie de la transsulfuration et cibles du H ₂ O ₂ .	12
Figure 2.	Synthèse des réactions impliquant le glutathion.	15
Figure 3.	Courbe de croissance du cochon d'Inde de souche Hartley.	21
Figure 4.	Montage des pousses-seringues pour 4 animaux.	30
Figure 5.	Cage sur mesure pour un cochon d'Inde d'environ 300 g.	30
Figure 6.	Solutions mères de nutrition parentérale préparées par la pharmacie.	32
Figure 7.	Schéma chronologique du protocole expérimental.	36
Figure 8.	Recyclage enzymatique du glutathion (GSH) à partir du glutathion disulfure (GSSG) par la glutathion réductase (GR) en présence d'NADPH.	39
Figure 9.	Apports caloriques moyens pour chaque jour sous NP en kcal par kg de poids corporel par jour.	46
Figure 10.	Survie des animaux sous nutrition parentérale.	47
Figure 11.	Évolution du poids des animaux à l'étude au cours de la NP.	48
Figure 12.	Niveaux de GSH, de GSSG et du potentiel redox du glutathion au niveau hépatique, selon la diète.	75
Figure 13.	Niveaux de GSH, de GSSG et du potentiel redox du glutathion au niveau pulmonaire, selon la diète.	76

Figure 14.	Effet de la nutrition parentérale enrichie ou non en glutathion sur la teneur en protéines dans chaque tissu.	77
Figure 15.	Ratio d'incorporation de leucine tritiée (^3H) dans le foie.	80

Liste des abréviations

AA	acide aminé
AAE/NE	acide aminé essentiel / non-essentiel
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
CAS	cystéine-ARNt synthétase
CH ₃	méthyle
CVC	cathéter veineux central
DPM	désintégration par minute
ESPEN	European Society for Clinical Nutrition and Metabolism
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
FO	huile de poisson
g	gramme
γ	gamma
γ-GT	gamma-glutamyltransférase
GCL	glutamate-cystéine-ligase ou gamma-glutamylcystéine ligase
GPx	glutathion peroxydase
GSH	glutathion réduit
GR	glutathion réductase
GS	glutathion synthétase
GSSG	forme disulfure du glutathion

H ₂ O	eau
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
kcal	kilocalorie
kg	kilogramme
K _m	constante de Michaelis
L	litre
μ	micro
m	milli
M	molaire (millimole/litre)
MAT	méthionine adénosyltransférase
MBD	<i>metabolic bone disease</i>
min	minute
ml	millilitre
mV	millivolt
NADPH/NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NP	nutrition parentérale
•O ₂ ⁻	superoxyde
•OH	radical hydroxyle
pH	potentiel hydrogène
PNALD	<i>parenteral nutrition associated liver disease</i>
p/v	rapport poids sur volume
SAH	S-adénosylhomocystéine
SAM	S-adénosylméthionine

s.e.m.	erreur type à la moyenne
-SH	fonction sulfhydryle
SO	huile de soja
SOD	superoxyde dismutase
SO ILEs	mélange d'huiles végétales
v/v	rapport volume sur volume

Remerciements

J'aimerais grandement remercier mon directeur Dr. Jean-Claude Lavoie, qui m'a fait confiance et qui m'a guidé du début jusqu'à la toute fin de cette maîtrise. Parmi tant de choses, il m'aura transmis une passion pour l'apprentissage ainsi qu'une éthique et une rigueur de travail exemplaire, le tout avec une bonne humeur contagieuse. Grâce à Jean-Claude, c'est avec un esprit ouvert et beaucoup de détermination que j'entreprendrai mes futurs défis.

Ma co-directrice, Dre. Marisol Perez Marcogliese, est une vétérinaire exemplaire. Merci pour l'aide, le soutien et l'encadrement durant tout le temps passé avec les animaux.

Je ne remercierai jamais assez mes collègues de laboratoire, qui ont été tout aussi généreux. La réussite de ce projet aurait été impensable sans le travail magistral de Clémence Guiraut, Vitor Teixeira, Angela Lengo Mungala, Ibrahim Mohamed, et Thérèse Rouleau.

Je tiens aussi à saluer le travail professionnel des tous les employés de l'animalerie du CHU Ste-Justine. Ils ont été d'une aide et d'une générosité indispensable. Je pense notamment à Sonja L'Espérance et à André Delisle.

Finalement, j'aimerais remercier sincèrement le comité de jury qui aura évalué ce mémoire, soit Dre. Geneviève Mailhot et Dr. Prévost Jantchou.

Avant-propos

Les travaux du laboratoire d'accueil portent sur la nutrition parentérale. Plus spécifiquement, ces travaux de recherche portent sur les différentes molécules qui composent la nutrition parentérale complète, tel qu'elle est administrée aujourd'hui. Depuis plusieurs années, le laboratoire s'intéresse particulièrement à une population distincte pouvant y avoir recours, soit les nouveau-nés prématurés. Les publications récentes de l'équipe du laboratoire font état de l'effet pro-oxydant de la nutrition parentérale, et de son implication dans les complications métaboliques pouvant survenir chez ces nouveau-nés. Toutefois, la nutrition parentérale peut être administrée à tout âge, que ce soit dans l'enfance ou à l'âge adulte, et au même titre que les nouveau-nés, des effets secondaires surviennent. Les travaux présentés dans ce mémoire se rapporteront à l'implication du stress oxydant de la nutrition parentérale à l'âge pédiatrique et de ses effets secondaires, mais aussi de l'impact de l'enrichissement de cette dernière par un supplément prometteur.

Le supplément ajouté à la nutrition parentérale est le glutathion sous la forme disulfure (GSSG). La supplémentation sous la forme réduite du glutathion (GSH) est possible, néanmoins, l'expérience acquise par le laboratoire indique qu'en solution parentérale, le GSSG est plus stable (moins réactif avec les autres composants). Dès mes débuts au laboratoire, j'ai participé à divers dosages qui feront état de la stabilité du GSSG en solution parentérale dans de futures publications (résultats non présentés dans ce mémoire).

Le mode de présentation de ce mémoire est de type hybride. En effet, une part importante est accordée à la mise au point nous ayant permis d'établir une nutrition parentérale chez un nouveau modèle animal (le cochon d'Inde d'un mois de vie). Cette partie préliminaire est décrite dans la Méthodologie faisant suite à l'Introduction. Le succès de ce modèle a permis la rédaction d'un manuscrit prêt à être soumis au journal scientifique *The Journal of Nutrition* au courant de l'hiver 2019. Ce report est demandé par l'agent de brevet d'UNIVALOR, une société de valorisation de la recherche universitaire. Ce manuscrit présente les principaux résultats obtenus au courant de la maîtrise. Des résultats supplémentaires qui pourraient faire l'objet d'autres publications sont incorporés à la suite du manuscrit en vue d'enrichir la discussion et la conclusion générale faisant le point sur l'ensemble du travail.

Introduction

1. La nutrition parentérale

La nutrition parentérale (NP) est considérée comme un mode de nutrition alternatif qui dans certaines circonstances, a le potentiel d'améliorer, de maintenir et même de sauver la vie des individus qui en ont besoin [1-3]. La NP peut être indiquée lorsqu'un individu n'est pas capable de consommer suffisamment de nourriture de façon entérale pour combler ses besoins énergétiques. Elle peut être initiée dès la naissance, durant l'enfance ou à l'âge adulte [4-6]. Plusieurs patients reçoivent une NP à cause d'une insuffisance intestinale chronique résultant d'une maladie sévère, nécessitant parfois une intervention chirurgicale, telle que la maladie de l'intestin court, la maladie de Crohn ou des diarrhées chroniques. Ces maladies sont détectées la plupart du temps tôt dans la vie et la NP est alors indiquée dès l'enfance [7, 8]. L'insuffisance intestinale chez l'enfant peut être définie de plusieurs façons, mais le consensus est le suivant : une perte importante de la fonction intestinale entraînant une absorption de nutriments inférieure aux besoins de l'organisme menant à la nécessité d'une NP [9]. Chez l'enfant*, la qualité de cette nutrition est d'autant plus importante puisqu'elle apporte des nutriments à un moment crucial de la croissance. Cet apport nutritif peut être assuré partiellement, voire totalement par voie intraveineuse pour une durée allant de quelques jours à plusieurs mois, à plusieurs années [10, 11].

* Le terme enfant utilisé dans ce mémoire fait référence à la période de la vie se situant entre le nourrisson et l'adulte.

1.1. Évolution de la nutrition parentérale chez l'enfant

Pour les enfants qui ne peuvent pas se nourrir de façon entérale, la NP est considérée comme un traitement essentiel [12]. Depuis son introduction il y a plus de 40 ans, elle a permis de sauver et de prolonger la vie de milliers d'enfants souffrant de troubles intestinaux sévères [13-15]. De nombreuses années de recherches fondamentales et cliniques ont permis d'approfondir nos connaissances sur les besoins vitaux de l'organisme en macro et micronutriments afin que cette nutrition soit complète et sécuritaire [16]. Toutefois, le traitement de ces enfants représente encore aujourd'hui un grand défi qui consiste à la fois à conjuguer la prise en charge en matière des soins cliniques et pharmacologiques, et à fournir un apport nutritif optimal pour soutenir la croissance et le développement normal [17]. En ce sens, sur le plan technologique, un grand travail de raffinement a été accompli en ce qui a trait à la qualité du cathéter (matériel utilisé), la technique d'insertion de ce dernier, les caractéristiques de perfusion (débit, concentrations des nutriments) et l'amélioration de l'asepsie afin de prévenir les infections liées à ce mode de nutrition. Cela permet aujourd'hui d'administrer la NP sur de longues périodes en réduisant le plus possible le risque de complications [18].

1.2. Technologie et voie d'administration

Du moment où il est prévu qu'un enfant reçoive une NP sur plusieurs semaines à plusieurs mois, la voie d'administration recommandée est par un cathéter veineux central (CVC). Le cathéter utilisé est fixé de façon permanente pour toute la durée de la NP [19]. Les matériaux constituant le cathéter, tels que le silicone ou le polyuréthane sont choisis en conséquence. Chez l'enfant, le CVC est inséré dans la veine jugulaire, subclavière ou fémorale, avec l'embout du cathéter reposant dans la veine cave. Cela facilite la perfusion d'une grande quantité de liquide,

comparativement à une veine périphérique qui aurait tendance à collapser. Le choix de la veine comme telle dépend de plusieurs facteurs, notamment de l'accessibilité et de la durée prévue de la NP. Lors de l'insertion, la préparation d'un champ stérile est obligatoire. La confirmation du positionnement optimal de l'embout est obtenue à l'aide de repères anatomiques ou d'ultrasons en temps réel. Plusieurs aspects de l'intervention chirurgicale pratiquée sur le modèle animal utilisé durant cette maîtrise reposent sur cette technologie. Malheureusement, la présence d'un CVC reste encore aujourd'hui le principal facteur de risque pour la venue de complications infectieuses, principalement bactériennes. Les soins d'hygiène nécessaires à la prévention des infections sont détaillés dans les derniers rapports de comités européens tels que ESPGHAN et ESPEN [18].

1.3. Composition en macronutriments

La NP est complète en macronutriments (glucides, lipides et protéines) et est composée selon les besoins individuels de l'enfant. Les recommandations spécifiques pour chacun des macronutriments sont établies en fonction du poids corporel et de l'état de santé de ce dernier et sont estimées entre autres à partir des mesures de métabolisme basal au repos, de bilans sanguins, de l'activité physique et de la croissance [20, 21]. Les concentrations particulières pour chacun de ces macronutriments sont établies conjointement avec les autres macronutriments en vue de rencontrer l'estimation des besoins caloriques totaux. Ces besoins peuvent être exprimés en kilocalorie par kilogramme de poids corporel par jour (kcal/kg/jour) ou par gramme de macronutriment par kilogramme de poids corporel par jour (g/kg/jour).

En plus des macronutriments, la NP contient des vitamines et minéraux qui sont essentiels à la croissance et au développement. Comme certaines vitamines peuvent être dégradées en présence de lumière ou simplement adhérer à la paroi du matériel de perfusion, la dose réelle administrée aux patients peut différer de la dose souhaitée [22]. Plusieurs minéraux essentiels tels que le zinc, le cuivre, l'iode, le sélénium et le manganèse sont aussi administrés et au même titre que les vitamines, les doses sont établies en fonction de l'âge, du poids ou autres besoins spécifiques de l'enfant [23, 24].

Traditionnellement en institution hospitalière, le dextrose, les acides aminés ainsi que les vitamines et minéraux sont administrés dans un même sac et les lipides séparément (solutions 2 en 1). Cela permet d'identifier rapidement si un composant de la NP précipite en solution. Toutefois, si la stabilité des composants le permet, il est souhaitable que l'entièreté des macronutriments soit contenue dans un seul sac (solutions 3 en 1). Cela permet entre autres de faciliter les soins pour les enfants qui reçoivent la NP à plus long terme en dehors d'un centre hospitalier [25].

Les glucides sont administrés par une solution de dextrose (D-Glucose). Le glucose est la principale source d'énergie utilisée par le corps humain, conséquemment, la majorité des calories sont obtenues par ce macronutriment [26]. La teneur en glucides en NP dépend de plusieurs facteurs tels que l'état de santé de l'enfant (critique, stable, en croissance), l'apport énergétique reçu par voie entérale, et plus spécifiquement l'équilibre entre la dépense énergétique et le risque d'apport excessif (au-delà des besoins énergétiques) [27]. L'apport excessif en glucose mène inévitablement au risque d'hyperglycémie chronique, favorisant ainsi

la lipogenèse et ultimement l'excès de gras tandis que l'apport insuffisant met l'enfant à risque d'hypoglycémie et de sous-nutrition. L'apport en glucides doit donc être individualisé afin de promouvoir la croissance et répondre aux besoins spécifiques de l'enfant. À titre d'exemple, un enfant en croissance pesant entre 11 et 30 kg peut recevoir de 2 à 4 g de glucides/kg/jour [27].

Les lipides sont administrés sous forme d'émulsions lipidiques et fournissent une source d'acides gras essentiels (acide alpha linoléique pour la série omega-3 et acide linoléique pour la série omega-6), tout en contribuant à l'absorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K). Chez l'enfant, les lipides contribuent généralement de 25 à 50% des calories contenues en NP [28]. Différents types d'émulsions lipidiques sont utilisés et leurs compositions en acides gras polyinsaturés peuvent différer considérablement. Généralement, les émulsions à base d'huile de soja pure (SO) sont les plus utilisées en Amérique du Nord, mais d'autres mélanges à base d'autres huiles végétales (SO ILEs) ou de poisson (FO) sont aussi utilisés en Europe [29]. Les différences entre ces émulsions sont essentiellement reliées à la composition en acides gras (mono ou polyinsaturés et moyen ou longue chaîne), et la présence de tocophérols (vit. E). Lorsqu'une NP est prévue pour plus d'une semaine, des recommandations récentes suggèrent l'utilisation de SO ILEs ou de FO, afin de mieux balancer l'apport en lipides. Les effets secondaires associés aux différentes compositions et dosages lipidiques représentent un champ de recherche en soi [30]. Les mécanismes par lesquels les lipides sont impliqués dans ces effets secondaires, notamment au foie, sont brièvement expliqués à la section : Désordres métaboliques et complications.

Les protéines sont des molécules structurelles et fonctionnelles essentielles de la cellule. Du point de vue biochimique, les protéines sont des polymères d'acides aminés (AA), et c'est sous cette forme qu'ils sont administrés en NP. Les 20 acides aminés qui vont former des protéines (protéinogènes) sont généralement classifiés comme essentiels (le corps n'est pas en mesure de les produire (AAE)) ou non essentiels (le corps les produit (AANE)). Les AEE sont donc obligatoirement obtenus par la diète (entérale ou parentérale). Pour soutenir une croissance optimale de l'enfant sous NP, toutes les solutions d'acides aminés commerciales contiennent les 9 AAE (histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine), en plus de certains AANE en concentrations suffisantes pour soutenir la synthèse protéique globale [31]. Par contre, dans certaines circonstances telles qu'une naissance prématuré, une NP, un trauma ou une infection grave, l'apport en AANE peut être insuffisant et ne pas rencontrer les besoins physiologiques de l'organisme pour supporter une synthèse protéique adéquate. C'est le cas de l'arginine, la glycine, la proline, la tyrosine, la glutamine et la cystéine qui sont alors qualifiés de conditionnellement essentiels. Par exemple, la cystéine est conditionnellement essentielle chez les nouveau-nés, et c'est pourquoi elle est ajoutée à la NP chez ces derniers [32]. Mon projet de maîtrise a d'ailleurs été élaboré suite aux observations expérimentales du laboratoire d'accueil à ce sujet, suggérant une déficience en cystéine.

La concentration en acides aminés dans les formulations commerciales peut donc légèrement différer. Par exemple, au Canada, la formulation Travasol (Baxter, Toronto, ON, Canada) est fréquemment utilisée et ne contient pas de cystéine. C'est aussi le cas des formulations Aminosyn II (Hospira, Lake Forest, IL, USA) et Aminoven (Fresenius Kabi, Toronto, ON, Canada). Néanmoins, d'autres formulations telle que Primène (Baxter, Toronto, ON, Canada)

contiennent de la cystéine. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces préparations commerciales dépend notamment des expériences antérieures des cliniciens avec ces dernières, mais aussi de la littérature scientifique motivant la présence de certains AA en solution [33].

Acides aminés	Aminosyn II 10%	Primene 10%	Travasol 10%	Aminoven 10%
L-Alanine	0,99	0,80	2,08	1,40
L-Arginine*	1,02	0,84	1,04	1,20
Acide L-Aspartique	0,70	0,60	-	-
Acide L-Glutamique*	0,74	1,00	-	-
Glycine*	0,50	0,40	2,08	1,10
L-Histidine	0,30	0,38	0,44	0,30
L-Isoleucine	0,66	0,67	0,48	0,50
L-Leucine	1,00	1,00	0,62	0,74
L-Lysine	1,05	1,10	0,58	0,93
L-Méthionine	0,17	0,24	0,58	0,43
L-Ornithine	-	0,32	-	-
L-Phénylalanine	0,30	0,42	0,62	0,51
L-Proline*	0,72	0,30	0,42	1,20
L-Sérine	0,53	0,40	-	0,65
Taurine	-	0,06	-	0,10
L-Thréonine	0,40	0,37	0,42	0,44
L-Tryptophane	0,20	0,20	0,18	0,20
L-Tyrosine*	-	0,05	0,04	0,04
L-Valine	0,50	0,76	0,46	0,62
L-Cystéine*	-	0,19	-	-

Tableau I. Concentration des acides aminés contenus dans les préparations d'acides aminés commerciales (g/100 ml). Aminosyn II 10% (Hospira, Lake Forest, IL, USA); Primene 10% (Baxter, Mississauga, ON, Canada); Travasol 10% (Baxter, Mississauga, ON, Canada); Aminoven 10% (Fresenius Kabi, Toronto, ON, Canada). * : acides aminés conditionnellement essentiels. Les données ont été obtenues à partir du site web des compagnies.

2. Effets secondaires de la nutrition parentérale

Le succès de la NP a eu comme effet que des enfants souffrant d'insuffisance intestinale qui mourraient fréquemment de déshydratation et de dénutrition dans le passé atteignent aujourd'hui l'âge adulte [2, 6, 34]. Même si des complications reliées à la voie d'administration peuvent encore se produire (infections, thromboses), d'autres complications reliées à l'évolution de la maladie primaire et aux conséquences de l'administration d'une NP sur plusieurs années peuvent également survenir.

2.1. Désordres métaboliques et complications

Le maintien d'une NP comme principale source de nutriments est à l'origine de plusieurs troubles métaboliques. Les plus connus sont d'origine hépatique, les plus documentés étant la stéatose et la cholestase. La cholestase touche principalement le nouveau-né tandis que la stéatose se manifeste plus souvent chez l'adulte [35, 36]. La cholestase, la stéatose et les autres complications de type hépatobiliaire en lien avec la dépendance à la NP sont définies en anglais par: *parenteral nutrition associated liver disease* (PNALD). La prévalence d'une PNALD chez les enfants sous NP à long terme est de 40 à 60% [2, 36]. La progression de ces maladies peut mener à des conditions plus sévères telle que la cirrhose et ultimement la transplantation hépatique. L'association entre le type d'émulsions lipidiques et la venue de complications hépatiques fait l'objet de beaucoup de recherches en laboratoire, tant animales que chez l'humain [2, 29, 36-38].

L'absence de stimulation intestinale et le prolongement d'une NP à long terme peut aussi affecter la santé osseuse et la croissance. Ce phénomène est défini en anglais par: *metabolic*

bone disease (MBD). Le développement du MBD est caractérisé par une mauvaise minéralisation et une diminution de la densité osseuse menant ultimement à l'ostéopénie et des fractures à l'âge adulte [39, 40]. Bien que plus de 40% des adultes recevant une NP à long terme développent une forme de déminéralisation osseuse, la prévalence d'une MBD chez les enfants n'est pas connue en raison de la variété de conditions menant à l'introduction d'une NP. Le risque de dénutrition, de déficience en vitamines et minéraux ainsi que les contaminants de la NP seraient en partie responsables de l'incidence de ces maladies [41].

Un apport calorique inadéquat qui requiert une NP et une fonction intestinale altérée sont des facteurs de risques menant à une faible croissance chez l'enfant. Néanmoins, tout le raffinement apporté à la NP au fil du temps permet aujourd'hui à ces derniers d'atteindre une croissance normale [6]. Par contre, ce n'est pas le cas chez tous les enfants. Certains sont parfois plus petits ou plus légers, avec un faible poids ou une faible taille pour l'âge malgré un apport nutritionnel adéquat. En effet, certains auteurs rapportent que plusieurs enfants sous NP risquent d'éprouver un développement anormal, une faible croissance linéaire, un faible gain de poids et un retard de puberté [7, 12, 42].

L'étiologie des complications décrites ci-haut semble être multifactorielle. Parmi les causes possibles, notre équipe de laboratoire s'intéresse particulièrement à la présence de composants toxiques générés dans la NP qui pourraient, du moins en partie, être l'origine de plusieurs complications.

2.2. Stress oxydant et nutrition parentérale

La présence de molécules néfastes générées dans la NP est documentée depuis plusieurs années [43, 44]. En effet, la vitamine C, les acides aminés et les lipides réagissent en présence de l'oxygène dissous dans la NP. La réaction est catalysée par l'exposition de la riboflavine à la lumière ambiante et mène à la formation de molécules oxydantes contaminant la NP [45, 46]. En plus de réduire la disponibilité des nutriments, ce phénomène contribue à la formation du contaminant majeur de la NP, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [44]. En soi, la perfusion en continu de H_2O_2 peut causer un stress oxydant. D'une part, le H_2O_2 peut réagir en présence de l'anion superoxyde ($\cdot O_2^-$) et former le radical hydroxyle ($\cdot OH$), causant à son tour un stress oxydant radicalaire (réaction de Fenton) [47]. D'une autre part, le H_2O_2 est aussi une molécule stable qui est en mesure de diffuser facilement à travers la membrane cellulaire et agir à titre d'agent oxydant non radicalaire, ayant entre autres comme cible les acides nucléiques (ADN, ARN), les lipides et les protéines [48, 49]. Cependant, les concentrations élevées en protéines dans la cellule font d'elles la cible majeure des molécules oxydantes comme les peroxydes. Plus spécifiquement, l'oxydation de leurs composants, les acides aminés, peut grandement modifier la structure, la fonction enzymatique ou la fonction signalétique des protéines.[49, 50].

2.3. Impact des peroxydes sur la synthèse protéique

Parmi ces acides aminés, certains sont d'un intérêt particulier : la méthionine et la cystéine. Ces derniers sont considérés comme les principaux acides aminés soufrés (présence d'un atome de soufre), impliqués dans la synthèse protéique [51]. La méthionine, par son affinité avec les ARNt, est particulièrement importante dans l'initiation de la synthèse protéique, étant le premier acide aminé assemblé dans les ribosomes. La cystéine, quant à elle, joue un rôle crucial dans la

structure des protéines. Par sa capacité à former des ponts disulfures, elle contribue au repliement des protéines dans leur forme fonctionnelle, tandis que la disponibilité de son thiol (-SH) est primordiale pour la régulation des fonctions de plusieurs enzymes [51, 52]. Toutefois, cette particularité rend les protéines et les enzymes avec des résidus cystéine extrêmement sensibles à l'oxydation par les peroxydes, ce qui peut engendrer alors une perte de fonction [49].

L'une des enzymes clés de la synthèse protéique, la méthionine adényltransférase (MAT), catalyse la transformation de méthionine en S-adénylméthionine (SAM) [53, 54]. Cette réaction est définie comme la voie de la transsulfuration, principalement active au foie (figure 1). Cette réaction est d'importance capitale, d'une part, puisque SAM constitue le principal donneur de méthyle (CH₃) du corps humain : ce transfert de groupement CH₃ est nécessaire à la formation, l'activation ou l'inhibition d'une multitude de molécules telles que les acides nucléiques et les protéines [55]. D'une autre part, l'action de MAT peut servir de voie supplémentaire à la formation de cystéine, par la transformation de SAM en S-adénylhomocystéine (SAH) puis en homocystéine. Lorsque l'apport nutritionnel en cystéine est pauvre, cette voie de contournement est particulièrement importante afin de maintenir l'activité d'enzymes ou la synthèse de protéines requérant la cystéine.

Toutefois, il s'avère qu'une enzyme comme MAT possède des résidus cystéines. Elle est donc par définition très sensible à l'oxydation et la présence chronique de peroxydes provenant de la NP [56]. Ce concept a été validé, entre autres chez un modèle animal par le laboratoire d'accueil, où la présence de peroxydes dans la NP limite l'activité de MAT [53, 55, 56]. Comme MAT est une enzyme impliquée dans plusieurs voies métaboliques, l'altération de son activité met en

lumière l'ampleur des complications pathologiques pouvant être associées au stress oxydant [47].

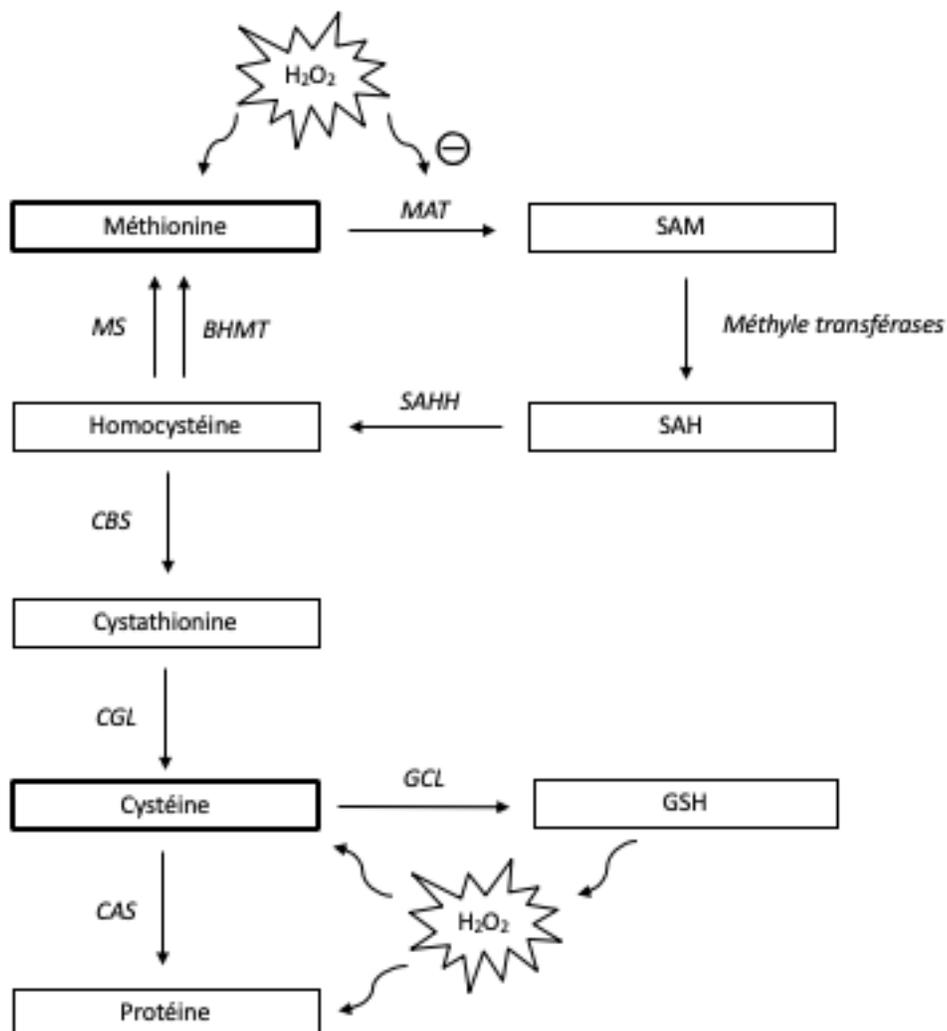


Figure 1. Voie de la transsulfuration et cibles du H₂O₂. BHMT : bétaine-homocystéine méthyltransférase; CAS : cystéine-ARNt synthétases; CBS : cystathionine bêta-synthase; CGL : cystathionine gamma-lyase; GCL : glutamate-cystéine ligase; GSH : Glutathion; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène; MAT : méthionine adénosyltransférase; MS : méthionine synthase; SAH : S-adénosylhomocystéine; SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase; SAM : S-adénosylméthionine. Adaptée de Brosnan et Brosnan [51].

D'autres publications du laboratoire ont validé la présence des peroxydes en NP et en mesurant leurs effets sur le métabolisme chez un modèle animal, mais aussi chez l'humain. Chez un modèle de cochon d'Inde néonatal sous NP, la présence d'un stress oxydant est associée à des complications telles que la stéatose hépatique [57], l'hypoalvéolarisation pulmonaire [58] et la perturbation du métabolisme énergétique [59]. Chez le nouveau-né prématuré, la présence des peroxydes dans la NP combinée à un système de défense antioxydant immature engendre une augmentation du risque de complications pulmonaires et de mortalité [60]. Récemment, une étude menée au CHU Ste-Justine a démontré que des enfants sous NP à long terme subissent aussi un grand stress oxydant [61].

3. Défense antioxydante contre les peroxydes

Pour neutraliser ces molécules oxydantes, les cellules possèdent plusieurs systèmes de défense antioxydants, notamment à l'aide d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces systèmes de défense ont pour fonction de prévenir ou d'éliminer le dommage oxydatif envers la cellule (figure 2, en noir). Comme le glutathion (GSH) est grandement impliqué dans la réponse antioxydante envers les peroxydes, il est par conséquent la molécule d'intérêt de ce mémoire.

3.1. Glutathion

Considéré comme le maître de la réponse antioxydante, le GSH (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) est la molécule de faible poids moléculaire soufrée la plus abondante de la cellule animale [62-64]. C'est dans l'hépatocyte où le glutathion a un rôle majeur de détoxification et d'élimination des xénobiotiques et de ses métabolites, protégeant la cellule du

stress oxydant, d'où sa concentration intracellulaire élevée (jusqu'à 10 mM). Le glutathion détoxifie aussi les peroxydes, qu'ils soient endogènes ou exogènes. Cette réaction est catalysée par les glutathion peroxydases (GPx) qui utilisent le GSH pour réduire le peroxyde d'hydrogène en eau. Le glutathion alors sous sa forme disulfure (GSSG) est rapidement converti à sa forme réduite (GSH) par la Glutathion Réductase (GR) en présence de NADPH (donneur d'électron) provenant du métabolisme des glucides (figure 2, cycle noir) [65]. Il participe également à une multitude d'autres réactions cellulaires, tel que le maintien des protéines thiolées sous leurs formes réduites, faisant de lui un déterminant majeur du contrôle de l'homéostasie du potentiel redox cellulaire. En raison de sa composition chimique, il constitue aussi un réservoir important de cystéine [63, 66].

Le GSH est formé à partir de 3 acides aminés par l'action séquentielle de deux enzymes, la glutamate-cystéine ligase (GCL) et la GSH synthétase (GS). Ces deux enzymes sont présentes au niveau intracellulaire et sont dépendantes de l'ATP. À partir de la cystéine et du glutamate, la GCL forme le dipeptide γ -glutamylcystéine, puis la GS combine ce dipeptide avec la glycine pour enfin former le GSH. Cette voie de formation du GSH est définie comme le cycle γ -glutamyl (figure 2, cycle bleu) [67, 68].

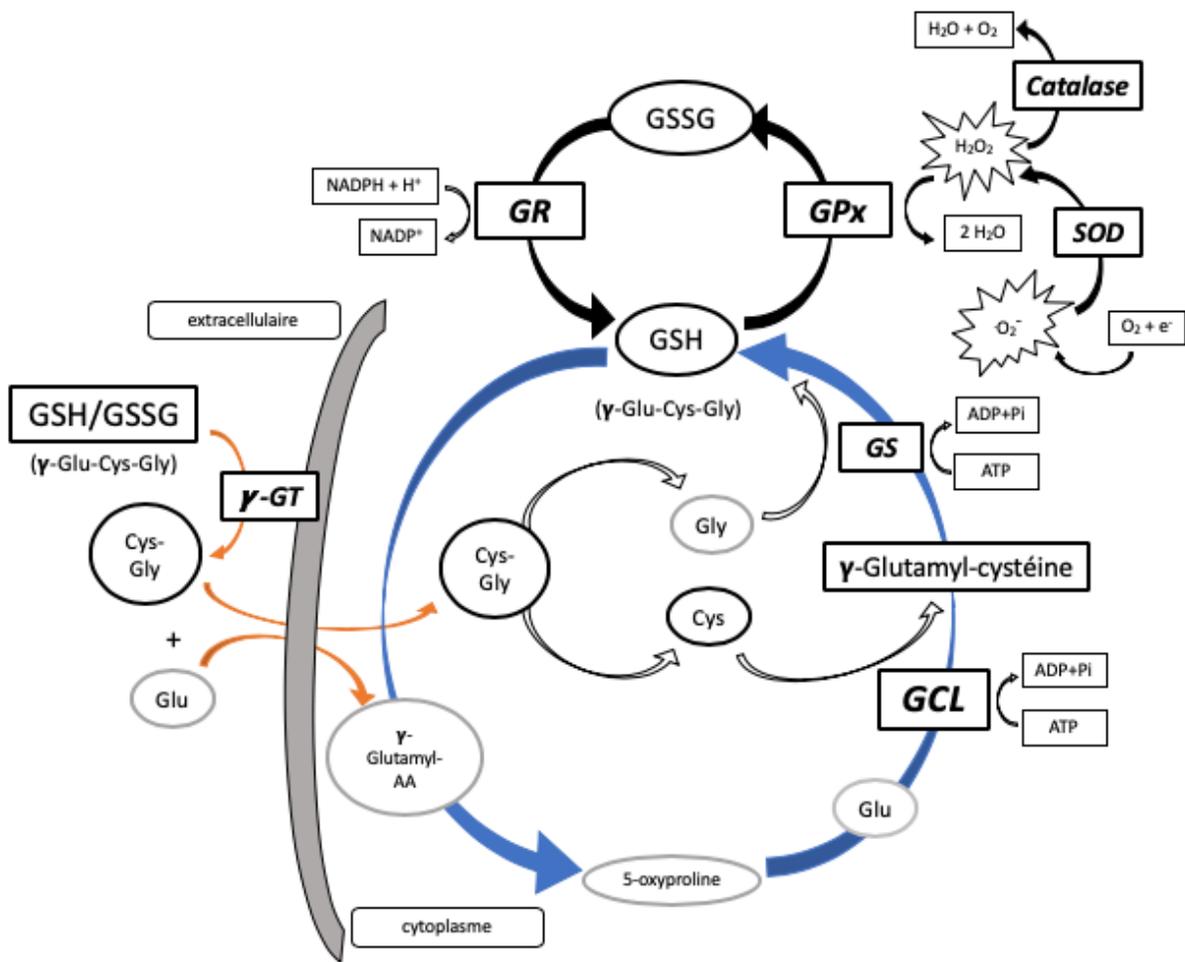


Figure 2. Synthèse des réactions impliquant le glutathion. En orange : Importation d'acides aminés dans la cellule à partir du GSH/GSSG extracellulaire; en bleu : Cycle γ -glutamyl et implication de la cystéine; en noir : Cycle redox et détoxification des peroxydes. AA : acide aminé; ADP+Pi: adénosine diphosphate + phosphate inorganique; ATP : adénosine triphosphate; Cys : cystéine; e⁻ : électron; GCL : glutamate-cystéine ligase ; γ -GT : gamma-glutamyltransférase; Glu : glutamate; Gly : glycine; GPx : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; GS : glutathion synthétase; H₂O : eau; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit; O₂ : oxygène; O₂⁻ : radical superoxyde; SOD : superoxyde dismutase. Adapté de Meister [67].

La synthèse du GSH est régulée par plusieurs facteurs, entre autres, par la régulation de l'expression de la première enzyme de synthèse (GCL) en réponse au stress oxydant, mais aussi par la biodisponibilité de ses substrats, notamment la cystéine. En effet, des données chez plusieurs espèces montrent que la biodisponibilité de la cystéine est généralement considérée comme limitante à la synthèse du glutathion [69, 70]. En effet, comparativement au glutamate et à la glycine, la concentration en cystéine présente dans la cellule est systématiquement et substantiellement plus basse. De plus, le K_m connu de la γ -glutamyl-cystéine pour la cystéine est égal sinon plus élevé que la concentration de cette dernière [71, 72]. La cystéine limite ainsi la synthèse de glutathion non seulement à cause de sa concentration en deçà du K_m , mais aussi en raison d'un faible pool de cystéine intracellulaire (de l'ordre du μM) devant soutenir un pool de GSH beaucoup plus grand (de l'ordre du mM) [62, 71]. Par conséquent, le foie utilise une autre voie enzymatique lui permettant d'obtenir cet acide aminé: la voie de la transsulfuration de l'homocystéine (figure 1). Comme mentionné précédemment, le foie utilise cette voie afin de transformer la méthionine en homocystéine puis en cystéine, ce qui permet de soutenir la synthèse de GSH (et aussi la synthèse protéique). Il est estimé que la moitié du pool total de GSH hépatique provient de la voie de la transsulfuration [73].

3.2. Exportation et importation

Le foie est considéré comme l'organe majeur de production et d'exportation de GSH vers les autres tissus [62]. En effet, le foie produit la majorité du GSH exporté au plasma, où sa concentration est de l'ordre du μM [66, 71]. Toutefois, le GSH (tout comme son équivalent oxydé GSSG) n'entre pas dans les cellules librement, mais bien sous la forme de ses constituants. Pour ce faire, l'enzyme γ -glutamyltransférase (γ -GT) située à la surface cellulaire

transfère la fraction γ -glutamyl du GSH/GSSG à un autre acide aminé, formant ainsi deux dipeptides: un γ -glutamyl-acide aminé et un cystéinylglycine [65]. C'est sous cette forme que ces dipeptides entrent dans la cellule où ils sont hydrolysés en acides aminés libres (figure 2, en orange). Pour former à nouveau le GSH, ces acides aminés entrent ensuite dans le cycle γ -glutamyl (figure 2, en bleu) [62].

3.3. Impact d'une déficience en cystéine

La voie de la transsulfuration est limitée à peu d'organes (foie, reins, intestin et pancréas). Par conséquent, afin d'obtenir la cystéine nécessaire à la synthèse de GSH et de protéines, les autres organes dépendent largement de l'apport en GSH plasmatique provenant du foie, et de sa dégradation par la γ -GT [71]. Par-contre, la cystéine en solution parentérale est perfusée directement dans le système veineux, ce qui est bien différent du passage normal (entérale) au foie par la circulation portale. De plus, les formulations commerciales d'acides aminés ne contiennent que peu sinon pas de cystéine [31]. Cela est dû entre autres à sa faible stabilité en solution, causée par sa tendance à être oxydée. Bien que cette forme oxydée, la cystine soit quant à elle stable, elle est peu soluble et précipite en solution [74]. La cystéine est donc un acide aminé avec une importance particulière. L'ajout de méthionine en NP se veut alors une alternative pour pallier ce problème. Toutefois, la perfusion chronique de peroxydes via la NP génère un stress oxydant qui inhibe la voie enzymatique de conversion de méthionine en cystéine (tel que discuté précédemment). Les enfants sous NP se retrouvent alors avec un double fardeau : un faible apport nutritionnel en cystéine, combiné à une forte demande en cystéine pour soutenir la synthèse de protéines (essentielle à la croissance) et la synthèse de GSH (nécessaire pour réduire les peroxydes). Ce concept est au cœur de ce mémoire de maîtrise.

Hypothèse et objectifs de l'étude

L'hypothèse: chez l'enfant en croissance, les peroxydes contaminant la NP réduisent la biodisponibilité de la cystéine et limitent ainsi la synthèse protéique globale et la synthèse de glutathion.

En se basant sur les connaissances acquises ces dernières années, **l'objectif général** est de déterminer si l'ajout de glutathion à la NP peut servir de procystéine pour maintenir la synthèse protéique, particulièrement chez un être en croissance, soit le cochon d'Inde. Le mécanisme proposé est l'enrichissement des cellules en cystéine par l'ajout de GSSG à la NP. Une fois en circulation, le GSSG est capté par la γ -GT, puis dégradé afin d'enrichir les cellules en cystéine. Cette cystéine favorisera la synthèse des protéines par les cystéine-ARNt synthétases (CAS) dont le Km pour la cystéine est beaucoup plus bas que le Km de la glutamate-cystéine ligase (GCL) [75, 76]. Une fois la synthèse protéique suffisante, la synthèse de glutathion servira à détoxifier les peroxydes provenant de la NP.

Les **objectifs spécifiques** :

1. Établir un modèle animal de nutrition parentérale sur plusieurs jours, par l'insertion d'un cathéter jugulaire : le cochon d'Inde en pleine croissance (4 semaines de vie) a été choisi.
2. Chez ce modèle, valider l'effet de la nutrition parentérale sur la croissance, la synthèse protéique et le stress oxydant.
3. Chez ce modèle, estimer l'impact de l'ajout de glutathion à la nutrition parentérale sur la croissance, la synthèse protéique et le stress oxydant. Le cochon d'Inde du même âge ne subissant pas d'intervention chirurgicale et recevant de la nourriture courante sert de référence.

Méthodologie

1. Préliminaires de l'étude

Pour établir un modèle animal de cochon d'Inde sous NP, une brève revue de la littérature à ce sujet a été effectuée, afin d'établir un nouveau protocole expérimental.

1.1. Établissement d'une NP chez un modèle animal

Stanley J. Dudrick fut l'un des pionniers à obtenir des résultats favorables à l'utilisation d'une nutrition parentérale (NP) sur une période prolongée chez l'animal (chien), ainsi plusieurs autres modèles ont découlé du succès de ses travaux [77]. Traditionnellement, les animaux utilisés en recherche sur la NP sont le chien, le chat, le rat, et plus récemment le porcelet. Chacun de ces mammifères offre des avantages et des inconvénients qui lui sont propres [78-80]. Notre modèle animal sous nutrition parentérale est le cochon d'Inde de souche Hartley. Ce modèle est relativement peu utilisé. La dernière utilisation du cochon d'Inde en croissance, soit de 1 à 4 mois de vie, remonte à plus de trente ans [81]. À cette époque, Lu et al. ont rapporté que le cochon d'Inde était un modèle animal viable sous NP pour plusieurs jours. Néanmoins, dans cette étude, seulement 57% des animaux ont survécu jusqu'à 25 jours sur NP. Les auteurs en venaient à la conclusion que beaucoup de travail restait à faire en vue de définir les conditions optimales nécessaires à la croissance de cet animal au courant d'une NP.

1.2. Précédent modèle animal du laboratoire d'accueil

Le cochon d'Inde néonatal (3 jours de vie) est utilisé de routine au laboratoire d'accueil. Plusieurs chercheurs ont eu recours à ce modèle néonatal depuis plusieurs années et de nombreuses publications rapportent le succès de son utilisation [58, 59, 82, 83]. Toutefois, entre

autres en raison de la difficulté de l'intervention chirurgicale, nous sommes la seule équipe à utiliser ce modèle actuellement.

Le cochon d'Inde possède des caractéristiques métaboliques très pertinentes en recherche en nutrition puisqu'à l'instar de l'humain, cet animal ne possède pas la gulonolactone oxydase, soit l'enzyme qui permet la formation endogène d'acide ascorbique (vitamine C). L'apport en vitamine C doit donc être exogène et contenu dans la diète entérale ou via la NP [84]. L'absence de vitamine C dans la diète mène au développement de plusieurs complications cliniques, dû notamment à son rôle d'antioxydant. Concernant notre axe de recherche particulier (santé métabolique), cela constitue un net avantage puisque la vitamine C ajoutée à la NP agit à titre de donneur d'électrons, contribuant à la formation des peroxydes contaminant la NP [46]. De plus, contrairement au rat, le cochon d'Inde possède une vésicule biliaire, organe d'importance dans le métabolisme hépatique. À titre d'exemple, la cholestase, effet secondaire fréquent associé à la prématurité et la NP, consiste en une réduction du débit biliaire du foie vers le duodénum, signe d'une dysfonction hépatique.

L'abondance de littérature scientifique chez d'autres modèles, combinée à l'expertise de ce laboratoire sur le cochon d'Inde néonatal nous permet de croire qu'un nouveau modèle plus âgé (1 mois de vie) est tout aussi pertinent pour l'étude de faisabilité et d'impact de la NP sur le métabolisme.

1.3. Nouveau modèle animal

Comme l'objectif de ce mémoire est de montrer l'effet du glutathion sur la synthèse protéique et le stress oxydant et d'extrapoler les résultats chez l'enfant en croissance, le modèle animal étudié doit inévitablement être en croissance, et si possible d'âge prépubère. À 1 mois de vie, le cochon d'Inde est sevré tout en n'étant pas à l'âge où il est apte à la reproduction [85]. Sa vitesse de croissance est également à son plus élevé (figure 3). Cela nous permet de croire qu'il est comparable à l'enfant prépubère sous NP.

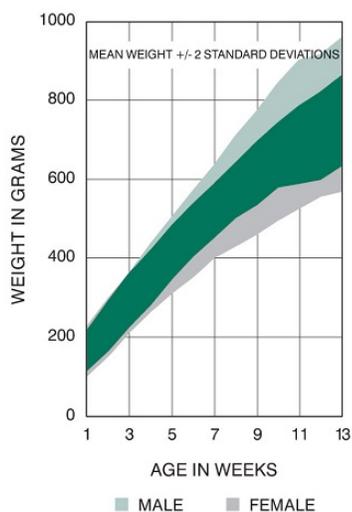


Figure 3. Courbe de croissance du cochon d'Inde de souche Hartley. Source : Laboratoires Charles River. (www.criver.com)

Dans le but d'avoir un comparatif à un enfant qui reçoit la NP sur plusieurs jours à plusieurs semaines, le projet initial visait une NP chez l'animal d'une durée de 8 à 14 jours. Avec les données antérieures récentes du laboratoire sur l'impact métabolique d'une NP infusée sur 4 jours [59, 86], il était juste de penser qu'au moins 8 jours allaient être nécessaires pour montrer l'impact de la NP sur la synthèse protéique et le stress oxydant. Par contre, nous avons conclu

durant la partie pilote (figure 10) qu'il était plus réaliste de viser 5 à 6 jours sous NP avec une durée totale de 7 à 8 jours avec le cathéter en place. Ce sont les difficultés rencontrées au cours du pilote qui ont motivé ce choix de modifier le protocole expérimental. Le fait d'induire une NP et de la maintenir sur seulement une semaine fut beaucoup plus difficile que prévu. Par conséquent, nous avons choisi de perfuser la NP durant 5 jours afin d'être confiant d'obtenir des résultats concluants et reproductibles. À ce moment, nous avons déterminé avec nos données du pilote que 5 jours de NP allaient être suffisants pour atteindre un plateau dans le débit de perfusion, détail essentiel pour ajouter le traceur radioactif à la NP.

1.4. Choix de la diète

Les apports nutritionnels de la NP doivent être équilibré en macronutriments afin de supporter la croissance, comme cela est pratiqué chez l'enfant. Toutefois, chez le cochon d'Inde de laboratoire, peu d'information est disponible en ce qui concerne les besoins nutritionnels apportés par voie parentérale. De plus, la composition spécifique en nutriments peut différer largement d'une référence à l'autre, en vue de répondre aux besoins énergétiques estimés des différents modèles animaux [80, 87]. Aussi, depuis Lu et al., aucune donnée récente sur le cochon d'Inde ne suggère une quantité précise de nutriments à donner lorsque ce dernier est sous NP [81]. Les concentrations en macronutriments ont donc été établies en parallèle avec les recommandations entérales pour cochon d'Inde [84] et en fonction des données parentérales publiées chez le rat et le lapin [79, 87], tout en restant près des valeurs des précédents travaux du laboratoire [53, 88]. Une proportion égale au 2/3 de l'énergie sous forme de glucides et 1/3 de l'énergie sous forme de lipides donnent une idée générale de l'apport calorique que nous devions viser [24].

Choix du GSSG

Dans un contexte pathologique de nutrition parentérale, plusieurs suppléments ont été étudiés. Peu d'entre eux (excluant le glutathion) ont eu le succès attendu [74, 89, 90]. L'utilisation du glutathion (sous forme réduite GSH) comme supplément dans un contexte pathologique est variée mais aussi très limitée [91-93], et exclusive au laboratoire d'accueil sous sa forme oxydée GSSG dans un contexte de NP. Néanmoins, l'une des premières publications sur l'effet du glutathion (GSH) en tant que supplément intraveineux remonte à 1996 par L.A. Brown et al. [94]. À la différence de la méthode utilisée dans le présent mémoire, la méthode de perfusion utilisée dans cette étude fut intrapéritonéale. Toutefois, la dose de GSH (1 mM) se compare dans une certaine mesure à la dose maximale utilisée dans le présent mémoire. À ce sujet, l'utilisation du GSSG est favorisée maintenant au GSH en raison de sa stabilité (demi-vie du GSH de 3 heures seulement). La dose de 10 μ M de GSSG a été établie comme suffisante afin d'élever les niveaux totaux de glutathion plasmatique, d'après des résultats antérieurs du laboratoire avec le même animal d'une semaine de vie [58]. La dose de 100 μ M de GSSG a été mise à l'épreuve afin de savoir si un effet dose-réponse serait observable.

Caractéristiques des diètes	Nutrition parentérale du cochon d'Inde néonatal. (8,7% D, 2% AA, 1,6% LIP, 1% MV)	Nutrition parentérale de l'étude. (10% D, 2% AA, 2% LIP, 1% MV)	Nutrition solide. Tecklad global guinea pig diet. (33,5% G, 3,3% LIP, 18,7% P)
Densité énergétique	0,57 kcal/ml	0,66 kcal/ml	2,5 kcal/g
Consommation théorique	180 à 200 ml/kg/jour	150 à 180 ml/kg/jour	60 g/kg/jour
Apport calorique	103 à 114 kcal/kg/jour	100 à 119 kcal/kg/jour	150 kcal/kg/jour

Tableau II. Caractéristiques des diètes parentérales du laboratoire et de la nourriture entérale habituelle pour cochon d'Inde. AA : acides aminés; D : dextrose; G : glucides; LIP : émulsions lipidiques; MV : vitamines; P : protéines.

1.5. Pilote de l'étude

Le pilote consiste en une mise au point du nouveau modèle animal et s'est échelonné sur plusieurs semaines en début de maîtrise (été-automne 2017). Malheureusement, plusieurs problèmes ont été rencontrés avec les premiers animaux. Par conséquent, ils n'ont pu être inclus dans l'étude. Toutefois, ce pilote nous a permis d'apporter plusieurs ajustements et modifications au protocole initial afin de ne plus rencontrer ces problèmes avec les futurs animaux de l'étude. Cette section du mémoire se veut une synthèse de tous les ajustements.

1.5.1. Préparation de l'intervention chirurgicale

L'intervention chirurgicale comme telle vise à insérer un cathéter permanent dans la veine jugulaire externe de l'animal. Bien que cette technique fut pratiquée de routine au laboratoire (sur des cochons d'Inde néonataux), la chirurgie en soi est très difficile pour un novice. Cela requerra donc une formation donnée par la coordonnatrice de recherche du laboratoire d'accueil (avant son départ pour la retraite), en plus d'une visite dans un autre centre de recherche (CRCHUM) afin d'observer la procédure sur des rats. Une fois ces connaissances acquises, une pratique documentée de la technique fut exécutée sur plus d'une vingtaine de rats destinés à l'euthanasie, le tout supervisé par ma codirectrice, Dre Marisol Perez Marcogliese, vétérinaire en chef de l'animalerie du CHU Ste-Justine.

Plusieurs modifications furent apportées afin de s'assurer du succès de la procédure et par conséquent le bien-être de l'animal. Premièrement en s'assurant d'un choix judicieux de l'anesthésiant à utiliser puisque la procédure de chirurgie peut induire de la douleur à l'animal. Pour ce faire, une double méthode d'anesthésie fut pratiquée (injection et gaz par inhalation) contrairement à une simple méthode par injection. En effet, le cochon d'Inde a la capacité de retenir son souffle lorsqu'une induction à l'anesthésie par gaz est effectuée [85]. Aussi, un animal d'un mois de vie (vs néonatal) est plus lourd et requiert une chirurgie plus longue. Cela nécessite une dose importante d'anesthésiant requérant de multiples injections, ce qui suggère une alternative, soit l'apport d'anesthésiant par un masque, dans le but de favoriser le confort de l'animal et d'éviter la douleur. De plus, le cochon d'Inde est un modèle plus sensible et fragile que le rat lorsqu'il reçoit un anesthésiant, ce qui mène à une grande variabilité dans les doses recommandées. Ainsi, la revue des méthodes publiées chez le cochon d'Inde, combinée aux

recommandations vétérinaires a fait en sorte qu'une double méthode d'anesthésie fut choisie [95, 96]. Conséquemment, la méthode consiste à utiliser un mélange de kétamine et de xylazine par injection, suivi d'un maintien d'anesthésie par l'inhalation d'isoflurane.

Le maintien de l'anesthésie par l'inhalation d'isoflurane requiert que l'animal reçoive en permanence un gaz par un masque pour toute la durée de la chirurgie. Cela fait en sorte que la zone de chirurgie (niveau du cou) est potentiellement encombrée par le masque. Pour pallier cela, une tentative d'insertion du cathéter dans la veine fémorale (au niveau de l'aîne de l'animal) fut tentée. Par contre, il s'est avéré que chez le cochon d'Inde, la veine fémorale n'est pas apte à supporter un cathéter permanent (information obtenue des Laboratoires Charles River, Saint-Constant, Canada). Le retour à la jugulaire avec un masque adapté plus petit (masque félin grandeur 0, Dispomed, Joliette, Canada) fut alors la technique retenue.

Aussi, due à la grosseur de l'animal, une modification fut apportée au cathéter destiné à la jugulaire. Comme la distance entre l'entrée du cathéter dans la veine jugulaire et la veine cave supérieure est légèrement plus grande qu'avec des cochons néonataux, un allongement de six millimètres de la partie interne du cathéter fut nécessaire (GPJV-05, SAI infusions technologies, IL, USA). D'autres changements furent apportés tels que l'achat de nouveau matériel chirurgical, la stérilisation par autoclave des instruments et l'administration d'un analgésique (Carprofen, Zoetis Inc., MI, USA) en vue de favoriser le plus possible le bien-être des animaux.

Puisque la méthode pratiquée a grandement été modifiée comparativement aux travaux antérieurs du laboratoire d'accueil, nous avons cru pertinent de présenter ici l'ensemble de la

procédure chirurgicale telle que proposée au Comité Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine (CIBPAR).

1.5.2. Protocole proposé

Une dose d'anesthésiant est donnée avant la chirurgie (mélange de : 87 mg/kg Kétamine (100 mg/ml) et 13 mg/kg xylazine (20 mg/ml)), aiguille 26G, voie intrapéritonéale. Un antibiotique (Baytril 10mg/kg, 50mg/ml) est injecté par voie intramusculaire dans la cuisse gauche (seringue 1cc, aiguille 26G) en une seule dose, en plus d'un analgésique (Rimadyl, 4 mg/kg/24hrs) en sous-cutané. Les deux zones de chirurgie sont rasées (haut du dos entre les omoplates et cou). Une pommade ophtalmique lubrifiante (Optixcare, CLC Medica) est appliquée pour prévenir l'assèchement des yeux. Les deux pattes avant de l'animal sont attachées avec du ruban le long du corps pour faciliter la contention et la manipulation. L'animal est ensuite installé et ce, tout au long de la chirurgie, sur un champ stérile (champ individuel, REF C9461) lui-même sur un plan incliné (favorisant le gonflement de la jugulaire) et un coussin chauffant. L'anesthésie est maintenue à l'Isoflurane (2-3%, 1-2L/min) via un masque adapté (Feline mask, grandeur 0, Dispomed). Les zones de chirurgie sont aseptisées avec une tige montée imprégnée de Chlorhexidine puis des gazes stériles imbibées d'une solution d'iode (Dovidine solution). Un analgésique topique (Lidocaïne 5%, Lidodan, Odan lab) est enfin appliqué au site d'incision. Une incision est pratiquée au site de chirurgie (haut du dos entre les omoplates et cou) et le tissu musculaire est ouvert par microdissection pour visualiser la veine jugulaire. La cavité est inondée de salin hépariné. Une microdissection est pratiquée pour dégager la jugulaire droite puis une incision est pratiquée sur le vaisseau à l'aide d'un ciseau à microchirurgie. Un cathéter en silicone (GPJV-05, SAI infusions technologies, IL, USA) est acheminé par un tunnel sous-

cutané formé par un trocart/capillaire de verre, du dos jusqu'au cou, où il est introduit dans la veine jugulaire puis poussé vers la veine cave supérieure. Le retrait de sang puis l'injection de 1-3 ml de salin hépariné permet de valider la mise en place du cathéter. Le cathéter est fixé grâce à deux soies (Perma-hand silk 4-0) glissés sous la veine côté proximal et distal (préalablement à l'incision) qui viennent sécuriser le cathéter au niveau des points d'ancrage. La première partie du cathéter sortant de la veine est cousue dans le muscle de l'épaule (Softsilk 6-0) pour empêcher le déplacement de ce dernier et le retrait lors des mouvements du cochon d'Inde. Le cathéter est extériorisé au dos (zone scapulaire entre les omoplates). Au moment de la fermeture de la plaie, celle-ci est inondée de salin hépariné puis suturée à l'aide de la soie (Perma-hand silk 4-0). Le site est désinfecté à l'iode. Une veste pour cochon d'Inde connecté à un téther métallique (SAH-12, SAI, USA) est mis à l'animal. Ce dernier est connecté à un pivot (QCS-S, SAI, USA). Le tout est soutenu par un montage sur mesure fixé solidement à la cage. Le pivot est finalement branché à une tubulure d'alimentation et un pousse-seringue permet une infusion calibrée en fonction du poids de l'animal. Le début de l'infusion se fera à débit grandement réduit (50%) pour ne pas endommager la veine, puis augmenté de façon progressive dans le premier 24 heures jusqu'à l'atteinte du débit de maintenance souhaité. L'utilisation d'une veste flexible ajoute du confort et l'ensemble de l'installation favorise la mobilité de l'animal dans tout l'espace qu'offre la cage. La chirurgie dure environ 35 minutes. Cette procédure est entièrement effectuée de façon aseptique pour prévenir toute infection au site (champ stérile, gants et instruments stériles, gazes stériles, etc.). Les instruments sont ré-stérilisés entre chaque animal.

1.5.3. Préparation de l'environnement

Beaucoup d'heures ont été consacrées à sécuriser et enrichir l'environnement où les animaux allaient recevoir la nutrition parentérale. D'abord, revoir la façon dont les animaux allaient être connectés aux pousse-seringues. Comme ce protocole incluait plusieurs manipulations d'animaux au long de la NP, il aura fallu modifier les cages afin de ne pas avoir à interrompre la perfusion lors des manipulations. Plusieurs dispositifs commerciaux sont disponibles sur le marché, mais très peu sont adaptés au cochon d'Inde. Conséquemment, des cages conventionnelles de rats (42 cm x 20 cm x 20 cm) furent modifiées afin de pouvoir supporter un couvercle sur lequel est fixé le dispositif de fixation du cathéter. Une ouverture longitudinale a été faite dans ces couvercles afin de permettre à l'animal de se déplacer dans toute la cage sans restriction. De plus, un montage spécial a été conçu afin de pouvoir fixer le téther et le pivot du cathéter au couvercle de la cage. Ce montage permet de sortir l'animal de la cage sans inconfort afin de le peser et inspecter le site de chirurgie, le tout sans débranchement, donc sans arrêter la perfusion et ainsi éviter la formation d'un caillot de sang dans le cathéter. De plus, les animaux étaient habillés de vestes sur-mesure permettant de sécuriser le cathéter au niveau scapulaire et d'envelopper le corps de l'animal d'une façon à ce qu'il adopte une posture naturelle durant la nutrition parentérale.



Figure 4. Montage des pousse-seringues pour 4 animaux.



Figure 5. Cage sur mesure pour un cochon d'Inde d'environ 300 g.

1.5.4. Préparation de la nutrition parentérale

Comme il s'agit de notre première expérience de NP avec des animaux plus gros, il aura fallu adapter la façon de préparer les solutions parentérales. Puisque la quantité de liquide théorique à perfuser était importante (4 animaux à la fois), il aurait fallu beaucoup de temps afin de seulement préparer ces solutions, et ce, à tous les jours. Pour pallier cela, nous avons collaboré avec la pharmacie de l'hôpital Ste-Justine afin que cette dernière prépare chaque semaine des solutions mères de nutrition parentérale à des concentrations prédéterminées. Cela représente un avantage considérable de temps. De plus, les solutions préparées à la pharmacie étaient d'une stabilité et d'une asepsie garantie, facteur important lors d'une NP sur plusieurs jours. Une fois les sacs de NP en main, ils étaient gardés au réfrigérateur pour toute la durée de la NP. Chaque jour, à la même heure, la quantité nécessaire pour une perfusion de 24 heures était retirée des sacs (de façon aseptique sous hotte biologique) avec deux seringues (une contenant la NP, les vitamines et le GSSG et l'autre contenant les lipides). Ces seringues étaient ensuite placées sur un pousse-seringue en remplacement de celles de la veille. Les vitamines et le GSSG étaient ajoutés aux solutions quotidiennement pour assurer une concentration stable dans le temps, au même titre que les expérimentations précédentes du laboratoire.



Figure 6. Solutions mères de nutrition parentérale préparées par la pharmacie. À gauche, solution complète (dextrose et acides aminés, minéraux) à laquelle sont ajoutés les vitamines et le GSSG. À droite, solution complète en plus des lipides.

1.6. Protocole final de l'étude

Voici une version détaillée de la méthode expérimentale présentée dans le manuscrit.

Modèle animal

Le protocole de recherche (#704) fut approuvé par le Comité Institutionnel de Bonnes pratiques Animales en Recherche (CIBPAR) du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine en respect du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Des cochons d'Inde de type Hartley (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Québec) d'un mois de vie d'approximativement 300 grammes furent utilisés.

Acclimatation et environnement

Immédiatement après leur arrivée, les animaux sont hébergés deux par deux dans une cage de polyéthylène jusqu'au jour de chirurgie. La salle d'hébergement est sous température contrôlée entre 23 et 25 degrés Celsius sur un cycle lumière-ombre de 12 heures. Les 5 jours suivants sont alloués à l'acclimatation, période pendant laquelle les cochons d'Inde ont accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

Chirurgie et pose d'un cathéter jugulaire

Les cochons d'Inde attribués aux groupes témoins ne subissent pas de chirurgie. Ils subissent par contre une ponction veineuse dans la veine saphène dans le but de récolter du sang, utile afin d'établir des valeurs de références biochimiques chez des animaux sans NP. Les détails de cette procédure ne requérant pas d'anesthésie sont disponibles à l'animalerie du CHU Ste-Justine. Les cochons d'Inde sous NP sont quant à eux anesthésiés (induction par une injection intra-péritonéale de kétamine 87mg/kg + xylazine 13mg/kg) en vue d'une chirurgie sous conditions aseptiques (autoclavage du matériel de chirurgie et présence d'un champ stérile). Les animaux sont installés sur le dos sur un tapis chauffant et maintenus sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (2-3%, 1-2L/min) par un masque sur mesure jusqu'à ce que la profondeur de l'anesthésie soit adéquate (vérifiée par la technique du *toe-pinch* et le rythme respiratoire).

Placement du cathéter

Un cathéter de silicone (SAI infusion technologies) est inséré dans la veine jugulaire externe droite et introduit jusqu'à la veine cave supérieure (1,5 cm), et ensuite sécurisé au vaisseau.

L'intégrité de la perfusion est confirmée par l'injection de salin hépariné 5 UI/ml, le cathéter est extériorisé à la zone scapulaire.

Port de la veste et récupération

Après avoir sécurisé la sortie du cathéter au niveau scapulaire, l'animal est placé dans une veste sur-mesure (Lomir Biomedical, Notre-Dame-de-l'Île-Perrot, QC, Canada) sécurisant le cathéter en place tout en lui permettant une amplitude de mouvement normale. Après la chirurgie, les animaux sont placés dans des cages individuelles avec accès à la nourriture et eau, sur tapis chauffant.

Monitoring

Une période de récupération de 48 heures est allouée à l'animal pendant laquelle il reçoit une perfusion intraveineuse de solution saline 0,9% héparinée 1UI/ml (via un pousse-seringue) à débit progressif (0,5 à 1,5 ml/heure). Durant cette période, l'animal a librement accès de l'eau et à de la nourriture habituelle pour cochon d'Inde. Le poids est mesuré quotidiennement et l'état général de l'animal est vérifié 3 fois par jour. L'animal est considéré comme apte à poursuivre une NP s'il récupère plus de 90% du poids initial pré chirurgie et si son état de santé général est adéquat.

Nutrition parentérale

Après 48 heures suivant la pose du cathéter, la nourriture est retirée et la NP exclusive est débutée. Les animaux ont accès à de l'eau de consommation durant toute l'expérimentation. Une solution mère de NP est préparée à la pharmacie de l'hôpital. Les vitamines et le glutathion

sont ajoutés au laboratoire. La NP est perfusée continuellement sur une période de 24 heures et changée tous les jours à la même heure. Sa composition est la suivante : Dextrose 10% p/v, acides aminés 2% p/v (Primène, Baxter, Toronto, ON, Canada), émulsion lipidique 2% p/v (Intralipid®, Fresenius Kabi, Mississauga, ON, Canada), vitamines 1% v/v (Multi-12, Sandoz, Boucherville, QC, Canada), électrolytes, et 1UI/ml d'héparine. Au courant de la NP, le débit de perfusion est augmenté afin d'atteindre 150 à 180 ml/kg de poids par jour. De plus, l'inspection du cathéter, du matériel de perfusion, des pousse-seringues et du débit est effectuée plusieurs fois par jour. Les animaux sont pesés chaque jour et la présence d'œdème est documentée, le cas échéant. Une fois le débit constant, un traceur radioactif tritié (^3H -leucine, 100 μCi) est ajouté au même moment que les vitamines et le glutathion (le cas échéant) à la NP. Ce traceur est présent dans la NP sur une période de 24 heures, du 3^e au 4^e jour de NP exclusive. Le dernier jour, la NP ne contient pas de radioactivité.

Sacrifice

Après 5 jours de NP exclusive, cette dernière est stoppée puis les animaux sont anesthésiés par l'inhalation à l'isoflurane et euthanasiés par exsanguination intracardiaque. En ordre chronologique, une ponction intracardiaque est effectuée afin de récolter la plus grande quantité possible de sang total (environ 6 ml). Par la suite, le foie, le poumon et le muscle sont prélevés et préparés selon les déterminations à venir et conservés sur glace sèche, puis à -80°C pour analyses subséquentes.

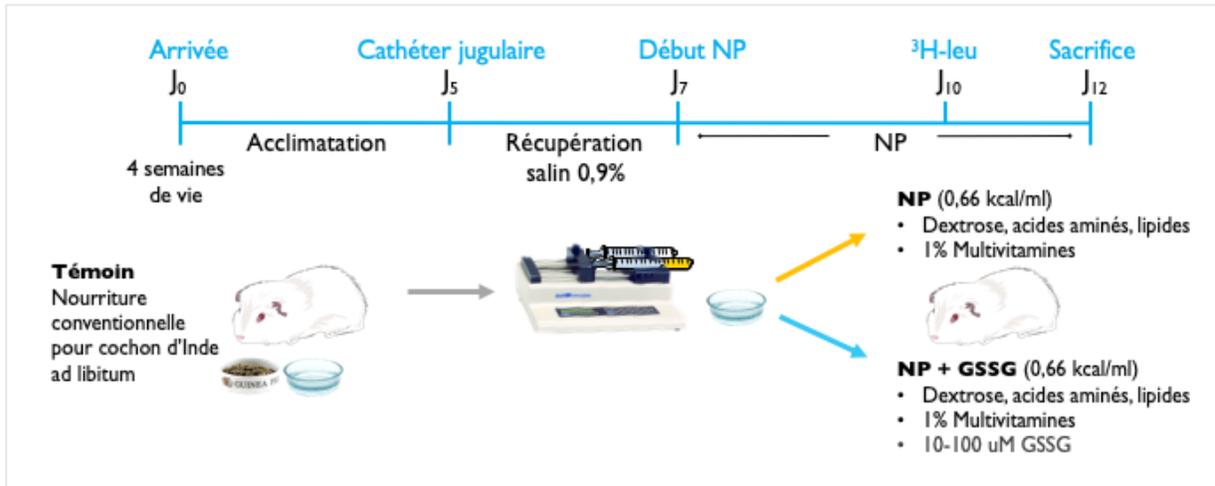


Figure 7. Schéma chronologique du protocole expérimental. Présenté lors de la journée de la recherche des cycles supérieurs nutrition, le 27 avril 2018.

2. Méthodes présentées dans le manuscrit

Plusieurs déterminations présentées brièvement dans le manuscrit ont été effectuées afin de produire les résultats. Cette section décrit ces méthodes en détail.

2.1. Dosage des peroxydes en solution parentérale par le FOX

Cette technique de dosage est utile afin de valider la présence de peroxydes générés dans les solutions de nutrition parentérale (NP) donnée aux animaux utilisés dans le protocole de ce mémoire. Cette méthode est basée sur l'oxydation de l'ion ferreux (Fe^{+2}) par les peroxydes. À bas pH, cette réaction forme l'ion ferrique (Fe^{+3}) qui à son tour réagit avec le xylénol orange (XO) et produit un complexe Fe-XO visible [57, 97]. La génération de peroxydes dans la NP varie dans le temps, le dosage simple se fait donc trois heures après avoir ajouté les vitamines aux solutions parentérales (au maximum de la cinétique de production de peroxydes [44]. Mélanger 100 μl de solution parentérale préalablement diluée (1/4 à 1/5) avec 1 ml de réactif FOX (XO 114 μM , FeCl_2 252 μM , hydroxytoluène butylé (BHT) 4 mM, acide sulfurique (H_2SO_4) 50,7 mM, le tout dans du méthanol). Bien mélanger et incuber ce mélange 30 minutes à température pièce. Une courbe étalon d' H_2O_2 de 0 à 100 μM est établie. Après centrifugation 1 minute à 10 000 RPM, la lecture des absorbances se fait au spectrophotomètre (Beckman Coulter) à 560 nm.

2.2. Dosage du GSH/GSSG par électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire de zone est une technique de séparation des composants d'un soluté, en fonction de leur charge et de leur taille. Cette séparation d'espèces contenues dans un mélange s'effectue au sein d'un flux d'électrolytes aqueux sous l'influence d'un champ

électrique, système P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) équipé d'un détecteur UV (200nm). Le champ électrique entraîne ces dernières dans un capillaire pour être enfin détectées via un détecteur UV puis visualisées dans un logiciel sous forme d'électrophérogramme.

Au sacrifice, le foie, le poumon et le muscle sont récoltés, nettoyés et pesés. Chaque tissu (0,25 g) est homogénéisé 2 fois (20 secondes) avec un Polytron (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) dans 5 fois son volume d'acide métaphosphorique 5% frais. Cet homogénat est ensuite centrifugé 4 minutes à 7 200g. Le surnageant (pour la détermination du glutathion) et le culot (détermination de protéines) sont divisés dans plusieurs épendorfs puis mis sur glace sèche jusqu'au transfert à -80 °C pour analyse subséquente.

Le jour de l'analyse, la séparation des espèces GSH et GSSG est faite à l'aide d'un capillaire de silice fondue de 75 µm de diamètre interne par 50 cm de longueur jusqu'à la fenêtre de détection. Avant chaque essai, le capillaire est conditionné/rincé avec du méthanol (10 minutes à 20 psi), du HCl 0,1N (10 minutes à 20 psi), de l'eau de qualité HPLC (2 minutes à 20 psi), du NaOH 1N (20 minutes à 20 psi), de nouveau de l'eau de qualité HPLC (4 minutes à 20 psi) puis finalement avec le tampon de migration (acide borique (75 mM), Bis-Tris (25 mM), à pH 8,4, filtré à 0,45 µm) à 20 psi pendant 10 minutes. Les échantillons sont quant à eux injectés à 0,5 psi pour une durée de 10 secondes, suivi d'une quantité d'eau aspirée à 0,2 psi pendant 10 secondes, à un voltage de 20kV pour une période de 10 minutes. Les concentrations de GSH et de GSSG sont extrapolées à partir de courbes étalons de GSH (0 à 100 µM) et de GSSG (0 à 10

μM) et le potentiel redox est calculé (25°C , $\text{pH } 7$) à partir de l'équation de Nernst : $E_{\text{hc}} = -240 - (59.1/2) \log ([\text{GSH}]^2 / [\text{GSSG}]) \text{ mV}$, en assumant que la densité du tissu est de 1.

2.3. Dosage enzymatique du glutathion total

Le GSSG enrichi à la nutrition parentérale sert entre autres à élever les taux de GSH dans le plasma, afin d'augmenter le recaptage de ses acides aminés par les tissus. Puisque la concentration plasmatique de l'ordre du $\mu\text{molaire}$ est sous le seuil de détection de la méthode par électrophorèse capillaire de zone, la technique retenue pour déterminer la concentration totale en glutathion est basée sur un principe colorimétrique de cinétique enzymatique, soit le recyclage enzymatique du GSH/GSSG par la glutathion réductase (GR), méthode originale adaptée par le laboratoire d'accueil [98]. En milieu acide, le glutathion réduit (GSH) réagit avec le DTNB (acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)) afin de produire un chromophore TNB (acide 5-thio(2-nitrobenzoïque) absorbant à 412 nm et le produit disulfure glutathion-TNB (GS-TNB). Le produit disulfure GS-TNB est ensuite réduit par la GR en présence de NADPH, résultant en un recyclage du GSH. Le taux de formation de TNB est proportionnel à la quantité de GSH dans l'échantillon. Puisque le produit de la réaction de la GR avec le GSSG forme 2GSH, les résultats sont multipliés par deux si l'on veut les exprimer en équivalent GSH.

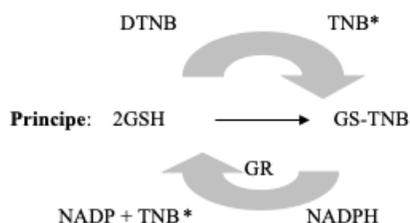


Figure 8. Recyclage enzymatique du glutathion (GSH) à partir du glutathion disulfure (GSSG) par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH.

Un échantillon de plasma est décongelé sur glace puis dilué dans un tampon TESB : Tris-HCl 50mM, EDTA-Na² 0,1 mM, L-sérine 10 mM (pour inhiber la γ -GT) et Borate 20 mM, pH 7,6 (le DTNB est plus soluble à ce pH). Ajouter à ce tampon 1 ml de mélange réactionnel : NADPH 0,8 mM, DTNB 0,6 mM et GR 30U/ml (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). La lecture des absorbances se fait immédiatement après l'ajout de la GR à 412 nm à intervalle de 1 minute pendant 8 minutes (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). C'est dans les quatre dernières minutes de la réaction que la pente (absorbance vs temps) est calculée sous prétexte que le recyclage du GSSG est maintenant linéaire. Une courbe étalon est établie avec un standard de GSSG (0 à 3 μ M) afin d'extrapoler les moyennes des pentes des échantillons. Puisque le produit de la réaction de la GR avec le GSSG forme 2GSH, les résultats sont multipliés par deux si l'on veut les exprimer en équivalent GSH.

2.4. Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales (mg par gramme de foie/muscle/poumon/200 μ l de sang total, g/L de plasma) est déterminée à partir des culots isolés post précipitation à l'acide métaphosphorique. Le culot des différents tissus ou plasma est décongelé puis solubilisé dans le NaOH 1N. La suspension est déposée sur plaque agitatrice jusqu'au lendemain à température pièce (la suspension de plasma peut être dosée immédiatement). Ensuite, une dilution supplémentaire (1/250) est effectuée dans de l'eau de qualité nanopure, pour enfin ajouter le réactif Bio Rad (préalablement dilué 1/5). Une courbe étalon d'albumine bovine (BSA) est établie (0,02 à 0,12 μ g/ μ l dosés) afin d'extrapoler les résultats.

2.5. Dosage de radioactivité dans la fraction protéique

Cette technique est utilisée afin de savoir si la présence de glutathion dans la NP a servi de réservoir de cystéine, acide aminé dont la disponibilité peut limiter la synthèse protéique globale. Cent microcuries (μCi) de leucine tritiée (L-[4,5- $^3\text{H}(\text{N})$]-) est ajoutée à la NP et sert de traceur radioactif afin d'estimer la synthèse protéique (PerkinElmer, Boston, MA, USA). La présence plus élevée de leucine ^3H dans les protéines suggère une incorporation plus élevée. Cet acide aminé est fréquemment utilisé pour l'étude de la synthèse protéique et du métabolisme des acides aminés [99, 100]. En tant qu'acide aminé à chaîne latérale ramifiée, il est choisi en fonction de son incorporation élevée au tissu musculaire [101].

La méthode consiste à décongeler 0,5 g de tissu puis homogénéiser sur glace (20 secondes) dans 5 fois son volume d'acide métaphosphorique 5% à l'aide d'un Polytron (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA). Contrairement à la méthode proposée par Kenessey et Ojamaa [102], l'acide métaphosphorique est préféré à l'acide trichloroacétique. D'une part afin de mieux quencher les protéines thiolées et d'autre part, la présence du chlore dans l'acide trichloroacétique interfère avec la scintillation [103]. L'homogénat est ensuite centrifugé 20 min (13 000g, 4°C) et le surnageant est conservé pour doser la leucine ^3H libre. Le culot est ensuite solubilisé avec du NaOH 1N sur plaque agitatrice jusqu'au lendemain. Le lendemain, 600 μl de l'homogénat est prélevé puis mélangé à 4 ml de liquide scintillant dans des fioles de verre, en vue d'être lue par un détecteur à scintillation Hidex 300 SL (Hidex, Turku, Finlande). Le nombre de photons émis par le scintillant en présence de l'isotope radioactif est calculé en fonction du temps, et est rapporté en unité radioactive de désintégrations par minute (DPM). L'activité radioactive, soit la présence de leucine tritiée dans l'échantillon, est ainsi rapportée en DPM.

Spécifiquement, le détecteur fait la lecture de radioactivité en ^3H bêta, pendant 250 secondes et la lecture est répétée 3 fois (l'effet temps minimise l'interférence par chimiluminescence). Les données sont comptabilisées dans le logiciel MikroWin (Labsis Laborsysteme, Neunkirchen, Allemagne). Le rapport DPM dans le culot de protéines sur DPM total dans le tissu (incluant le surnageant) est utilisé comme indice d'incorporation protéique. Ce résultat sous forme de rapport (DPM culot/DPM culot + surnageant) permet de réduire la variation inter-individu, et donc accroît le pouvoir statistique.

2.6. Dosage de l'hémoglobine

L'évaluation de l'hémoglobine des cochons d'Inde est faite au jour de la chirurgie et au jour du sacrifice. L'hémoglobine sert d'indice d'état de santé général des animaux sous NP, comparativement aux témoins. L'hémoglobine est déterminée par la méthode colorimétrique originale de Drabkin [104] adaptée par Sigma-Aldrich. La réaction est basée sur l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine en présence de ferricyanure de potassium. Le complexe cyanméthémoglobine a une absorption maximale à 540 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration totale en hémoglobine. Ajouter 20 μl de sang total à 5 mL d'une solution mère de Drabkin (1000 mL de Drabkin reagent et 0,5 mL de solution Brij L23 30%). Mélanger et laisser un temps d'attente de 20 min puis lire l'absorbance à 540 nm. Les résultats sont exprimés en mg/mL. Puisque deux temps de collecte sont évalués, elle peut aussi être exprimée en pourcentage de variation du jour de sacrifice par rapport au jour de chirurgie.

2.7. Dosage de l'urée

L'urée est le principal produit azoté du catabolisme protéique. Un taux plasmatique élevé peut refléter un catabolisme protéique élevé tandis qu'un taux bas peut refléter une déficience nutritionnel sévère en protéine. La méthode colorimétrique de détermination de la concentration en urée plasmatique par le diacétyl monoxime (DAM) et la thiosemicarbazide (TMZ) est une adaptation de la méthode originale de Fearon [105] par Rahmatullah et Boyde [106]. En milieu acide, le DAM est hydrolysé afin de produire le diacétyl qui se condense avec l'urée pour former un chromogène rose, absorbant à environ 520 nanomètres. Le TMZ et les ions ferreux sont ajoutés afin d'augmenter le développement de la couleur.

Le dosage simple de l'urée plasmatique sans déprotéinisation se fait de la façon suivante : Préparer le réactif A : DAM 16,6mM, TMZ 0,47mM (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) puis préparer le réactif B : FeCl₃ 0,21 mM, H₃PO₄ 0,01 M, H₂SO₄ 1,9 M. Ajouter 20µl de plasma à 1,5ml du réactif A puis brasser. Mélanger le tout à 3,0 ml du réactif B puis vortexer. Incuber sur block chauffant ou bain d'eau bouillante (100 °C) pendant 10 minutes. Transférer les échantillons dans un bain d'eau froide afin de ramener à température pièce puis lire l'absorbance à 525 nm (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). La concentration d'urée est extrapolée à partir d'une courbe étalon d'urée (0 à 150 mg/dl).

3. Analyses statistiques

Toutes les données furent analysées dans un classeur Microsoft Excel (Microsoft corporation, Seattle, WA, USA). Au même titre que dans le manuscrit, tous les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m. et les comparaisons orthogonales sont effectuées par ANOVA (mesures parallèles ou répétées selon le cas), après avoir validé l'homoscédasticité des variances par le Chi² de Bartlett. Le seuil de signification est fixé $p < 0,05$. Afin d'alléger le mémoire, les figures 9 et 11 ainsi que le tableau III illustrent les animaux NP \pm GSSG dans un même groupe puisqu'il n'y a pas de différence statistique significative pour ces paramètres.

Calcul d'effectif

Le calcul d'effectif se base sur les variables que nous connaissions, mesurées chez des cochons d'Inde sous NP enrichie ou non de GSSG : soit le GSH et le potentiel redox pulmonaire, ainsi le GSSG et le potentiel redox hépatique, basé sur nos expérimentations animales antérieures et le raffinement apporté. Initialement, un nombre de 4 animaux par groupe a été calculé afin de montrer une différence dans chacun des paramètres et une variance dérivée du S.E.M. global pour satisfaire un pouvoir statistique de 80% avec une erreur alpha à 5%. Toutefois, le présent projet restait une première pour notre équipe (animaux plus âgés, valeurs musculaires, taux d'incorporation de leucine tritiée) et par prudence, la décision de doubler le nombre d'animaux à 8 par groupe nous assurait de démontrer un effet, si l'effet existait.

Résultats

Pour faciliter la lecture, les Résultats sont divisés en trois sections. Tout d'abord les résultats concernant le modèle expérimental, suivi du cœur des résultats présenté sous forme de manuscrit et enfin des résultats supplémentaires.

1. Modèle expérimental

Les résultats de la partie pilote ainsi que de l'objectif spécifique qui était d'établir un modèle animal de nutrition parentérale sur plusieurs jours (non présentés dans le manuscrit) sont présentés ici. En incluant la partie pilote, un total de 30 cochons d'Inde ont été en mesure de récupérer adéquatement de la chirurgie de fixation d'un cathéter jugulaire en vue de recevoir une nutrition parentérale complète. Un cochon d'Inde n'a pas survécu à la chirurgie due à un arrêt respiratoire. La majorité des animaux de la partie pilote n'ont pas complété la nutrition parentérale (figure 10).

À la suite du pilote, le blocage du cathéter a engendré l'arrêt de la NP pour seulement 2 des 24 animaux utilisés. Tous les autres animaux ont reçu une NP dans le temps déterminé avec un état d'alerte et un comportement normal, en l'absence de symptômes de douleur ou de signe de faim. Pour la majorité, la reprise du poids initial 2 jours post-chirurgie était satisfaisante pour débiter la NP ($98 \pm 1 \%$, $n=24$). Les sites d'insertion du cathéter et les points de suture ont guéri adéquatement sans complication résultant d'infection ou de saignement. Le débit de perfusion de même que l'apport calorique ont progressé significativement avant d'atteindre un plateau au troisième jour de NP.

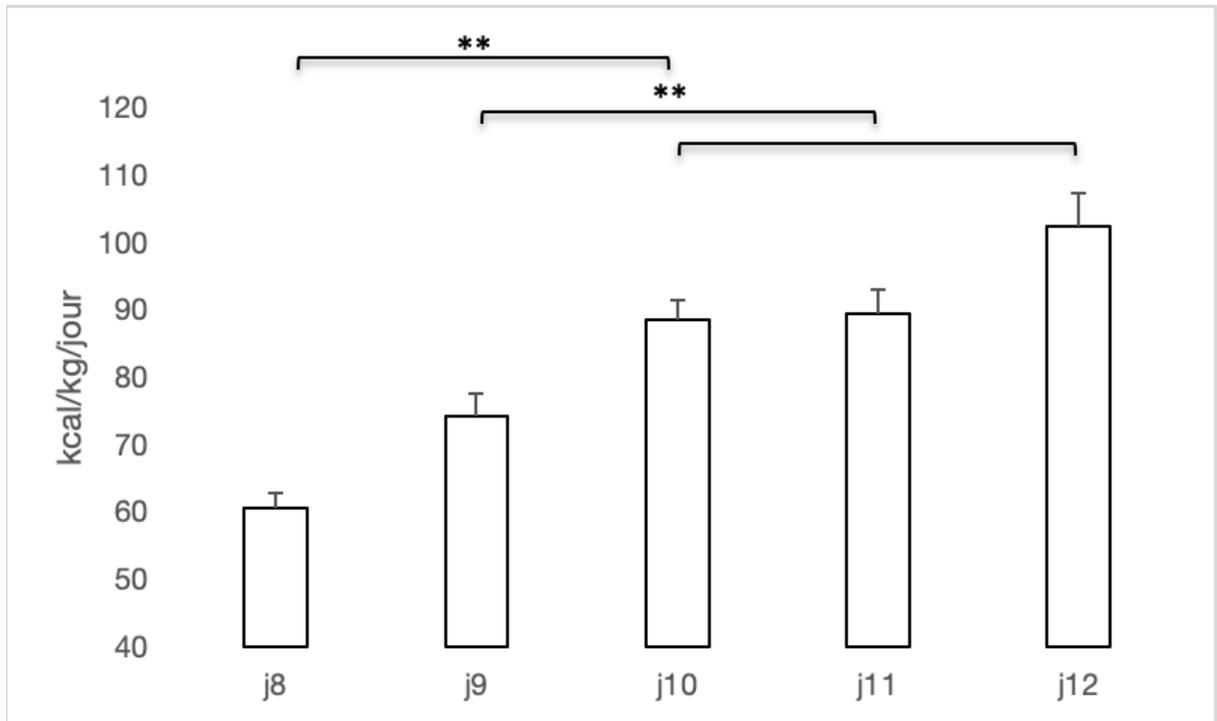


Figure 9. Apports caloriques moyens pour chaque jour sous NP en kcal par kg de poids corporel par jour (kcal/kg/jour). j8 : premier jour de NP ; j9 : deuxième jour de NP ; j10 : troisième jour de NP ; j11 : quatrième jour de NP ; j12 : cinquième et dernier jour de NP. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m., n = 22, ** : $p < 0,01$.

L'impact considérable qu'ont eu les ajustements sur la réussite de ce projet est illustré à la figure suivante.

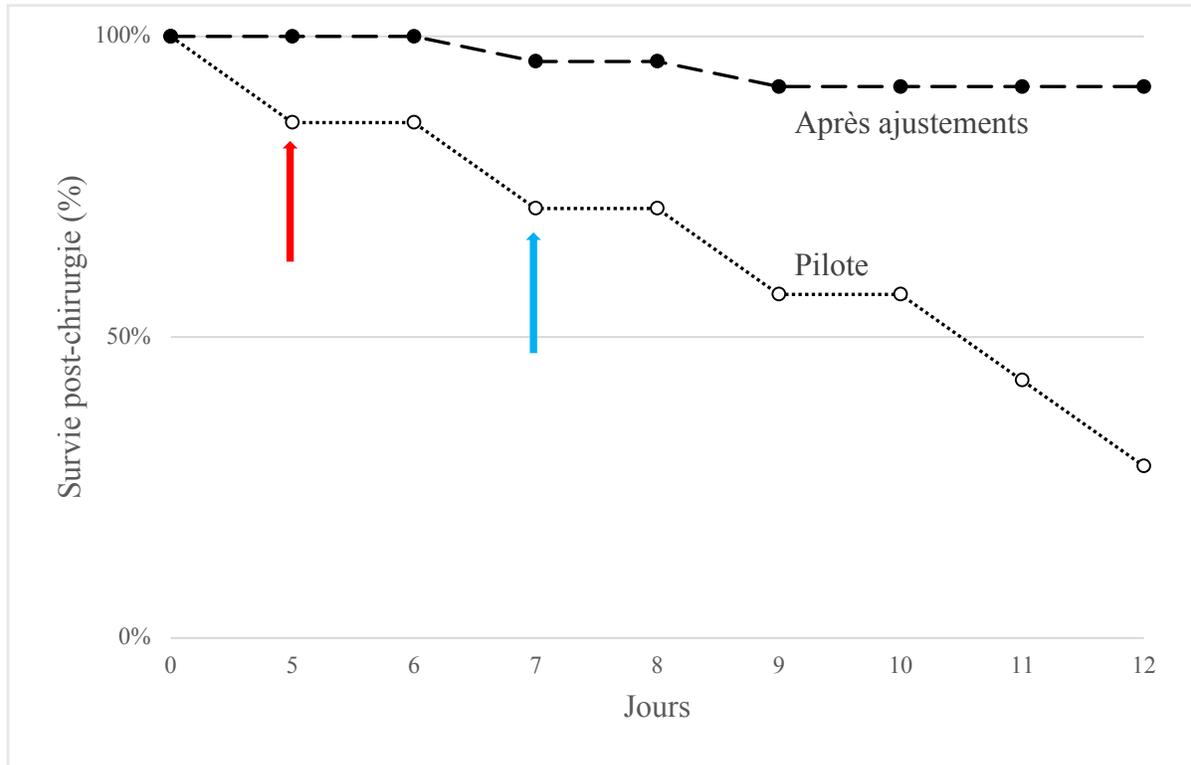


Figure 10. Survie des animaux sous nutrition parentérale. Pilote (été-automne 2017) : Survie 8 jours post-chirurgie : 29%, n = 7; Après ajustements (hiver-printemps 2018): Survie 8 jours post-chirurgie : 92%, n = 24. Les résultats sont exprimés en pourcentage, la flèche rouge représente le jour de chirurgie et la flèche bleue le début de la NP.

Suite à la chirurgie, la NP a induit un ralentissement de croissance chez tous les animaux sous NP, comparativement aux témoins ($p < 0,01$). Le manuscrit inclut dans ce mémoire illustre l'évolution du poids des animaux à l'aide d'une pente (**figure 1** du manuscrit). La figure suivante illustre d'une autre façon l'évolution du poids de tous les animaux utilisés pour l'étude.

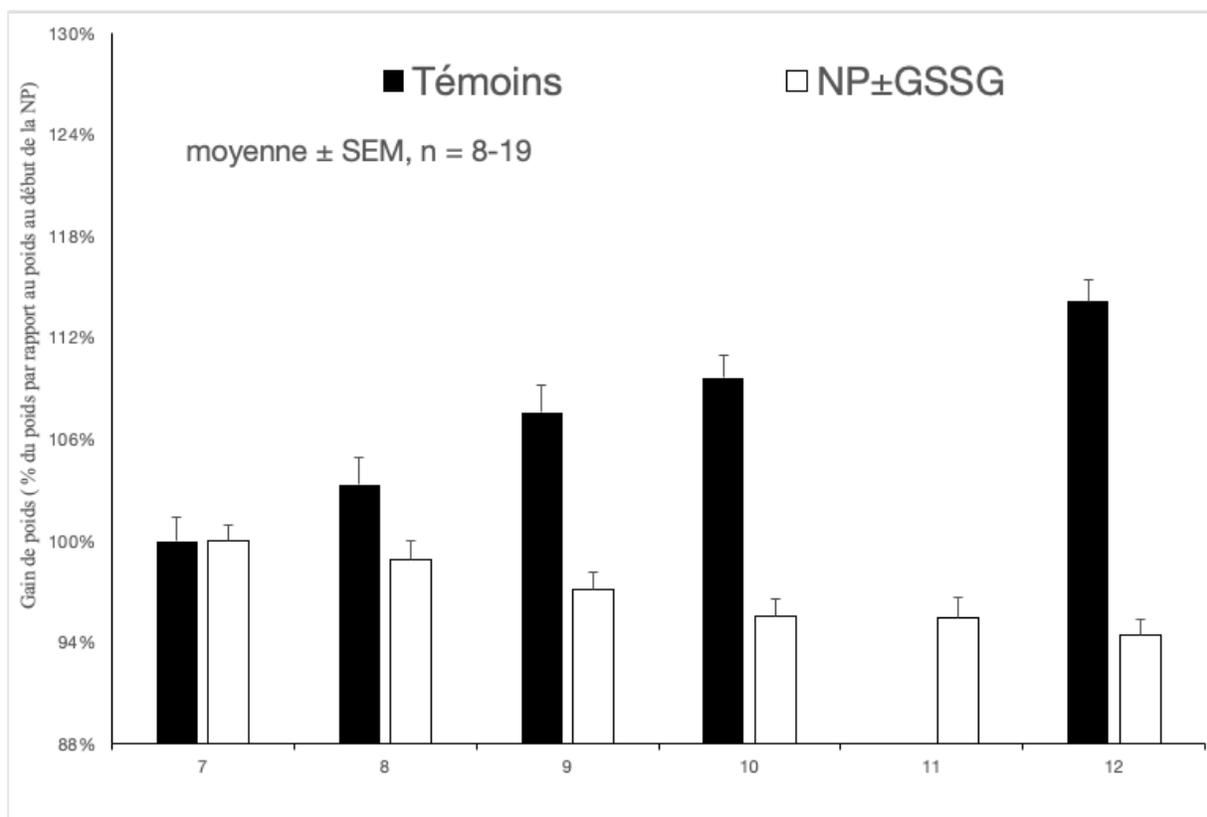


Figure 11. Évolution du poids des animaux à l'étude au cours de la NP. Poids à chaque jour par rapport au poids de départ de la NP (jour 7), exprimé en pourcentage (%). Témoins : animaux nourris de façon entérale; NP ± GSSG : nutrition parentérale enrichie ou non de GSSG. Le poids des animaux sous NP ± GSSG diminue de 6% comparativement à une hausse de 14% chez les témoins ($p < 0,01$). N.B. Les témoins n'ont pas été pesés au jour 11. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m., $n = 8-19$.

Finalement, le tableau suivant illustre l'évolution du poids de l'ensemble des animaux, du jour d'arrivée au jour du sacrifice, en plus du débit de perfusion moyen au terme de l'étude.

	NP±GSSG	Témoins
Nombre d'animaux	19	8
Poids j0 (g)	290±4	277±6
Poids j5 / Poids j0, %	115±1	121±2**
Poids j7 / Poids j5, %	98±1	103±1**
Poids j12 / Poids j7, %	94±1	114±1**
NP : ml/kg/jour	129±4	-
NP : kcal/kg/jour	85±3	-

Tableau III. Évolution du poids des animaux à l'étude en plus du débit et de l'apport calorique moyen au terme de la nutrition parentérale. NP : nutrition parentérale; NP±GSSG : Nutrition parentérale supplémentée ou non de glutathion; Témoins : Nutrition entérale; j0 : jour d'arrivée; j5 : jour de chirurgie; j7 : début de la nutrition parentérale; j12 : jour de sacrifice. Les résultats sont exprimés selon la moyenne ± s.e.m. ** : p<0,01.

2. Manuscrit prêt à être soumis au journal scientifique *The Journal of Nutrition*.

Cette section du mémoire présente le manuscrit produit en vue d'une publication. Les sources bibliographiques présentées à la fin de ce manuscrit, de même que les figures et tableaux sont indépendantes de celles du mémoire. Ma contribution à ce manuscrit réside dans la réalisation des travaux de recherche, l'analyse et l'interprétation des résultats. La rédaction du manuscrit fut réalisée en collaboration avec mon directeur Dr. Jean-Claude Lavoie et chacun des co-auteurs a contribué à la correction.

Glutathione disulphide supplement in parenteral nutrition as a source of cysteine to increase protein synthesis and antioxidant capacity in the guinea pig muscle.

Guillaume Morin^a, Clémence Guiraut^{a,b}, Marisol Perez Marcogliese^b, Ibrahim Mohamed^{b,c}, Jean-Claude Lavoie^{a,b*}

^aDepartment of Nutrition, Université de Montréal. 2405 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC, Canada H3T 1A8

^bResearch Center, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC, Canada H3T 1C5

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

***Address correspondence to:**

Jean-Claude Lavoie, PhD

Research Center, CHU Sainte-Justine

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine,

Montreal, QC, Canada H3T 1C5

Phone: 514 345 4931 ext 3940

E-mail: jean-claude.lavoie@umontreal.ca

Word Count: 2708

Number of figures: 5

Number of table: 1

Supplementary data submitted: 0

Running title (50 or fewer characters and spaces): **Adding glutathione to PN increases protein synthesis.**

Footnotes: PN: parenteral nutrition; GSH: reduced form of glutathione; GSSG: glutathione disulphide, oxidized form of glutathione, oxidized form of glutathione; Funding Source: Canadian Institutes of Health Research (PJT-148522); No conflict of interest.

2. Abstract

Background. Peroxides contaminating parenteral nutrition (PN) limit the use of methionine as a precursor of cysteine. Therefore, PN leads to a cysteine deficiency represented by a low level of glutathione, main molecule of peroxide detoxification, explaining the observed oxidative stress.

Hypothesis: the PN-induced limited availability of cysteine leads to a suboptimal protein synthesis, especially observed in growing children. Objective: to demonstrate that glutathione supplementation, used as procysteine, promotes protein synthesis and reduces oxidative stress in growing animal model of PN such as guinea pig.

Methods: A jugular vein catheter placed onto one-month-old guinea pigs allowed receiving PN. The study groups included: 1) control group: animals fed with regular food for guinea pig without any manipulation, 2) PN group: animals exclusively on standard PN (glucose, amino acids, lipids, electrolytes and multivitamins), 3) PN+10 μ M GSSG group: PN was enriched with 10 μ M GSSG, and 4) PN+100 μ M GSSG group: PN with 100 μ M GSSG. On days 3-4, PN was enriched with $^3\text{H-L-leucine}$ to evaluate protein synthesis. On day 5, blood and gastrocnemius muscle were collected. Haemoglobin, urea, glutathione, and $^3\text{H-L-leucine}$ incorporation were determined. Statistics: ANOVA with significance set at $p < 0.05$.

Results: The incorporation of $^3\text{H-L-leucine}$ was 57% higher in animals infused with glutathione-enriched PN ($p < 0.05$). The lower plasma protein concentrations observed in the PN group ($p < 0.01$) were back to control levels with glutathione supplementation. Glutathione supplementation prevented the increase in the level of oxidative markers (GSSG levels, GSSG / GSH ratio) observed in the PN group ($p < 0.01$).

Conclusion: Results reinforce the hypothesis of a limited availability of cysteine for metabolism of individuals under PN. Enriching PN solutions with glutathione could be an easy way to maintain protein synthesis and prevent oxidative stress by impeding cysteine deficiency.

Key words: Home parenteral nutrition; parenteral amino acids; sarcopenia; cachexia; pediatrics; glutathione supplement.

3. Introduction

Parenteral nutrition (PN) is essential for numerous people facing gastrointestinal difficulties. The causes are variable, ranging from intestinal insufficiency to need for nutritive support following clinical conditions for which enteral nutrition is impossible or limited (1). This mode of nutrition results from cutting-edge technologies that make possible to preserve all the nutrients in the same solution and to administer them intravenously. However, PN has multiple side effects (2). In the specific case of premature infants (3,4) and children under home parenteral nutrition (5), PN is associated with deleterious oxidative stress. These nutrients are reactive and some of them give electrons to the dissolved oxygen, generating peroxides (3,6-10). Peroxides inhibit the *in vivo* transformation of methionine to cysteine (11). In animals, this expected lower availability of cysteine is associated with lower glutathione level in various organs such as liver, lungs and blood (12,13). Since glutathione is essential for the detoxification of peroxides by glutathione peroxidases, an oxidative stress is observed in these animals. This stress is related to the presence of peroxides and not free radicals (14). Therefore, the oxidative stress marker related to PN is the oxidative status of glutathione (redox potential or GSSG / GSH ratio) (15). Oxidized redox potential of glutathione demonstrated in the lungs of guinea pigs was associated with a lower alveolarization index (12,14), an important characteristic of a chronic lung disease named bronchopulmonary dysplasia, frequently observed in extremely preterm infants (16-18). In addition, the increase in the concentration of peroxides in the urine during the first week of life (19) as well as oxidized blood redox potential (4,20) both predicted the development of this pulmonary disease in premature infants. The confirmation that these adverse effects of PN were linked to a low glutathione level was obtained by showing that the addition of glutathione in PN prevented both the increase in oxidative marker and

hyposalveolarization in animals (13). This supplement improved the *de novo* glutathione synthesis in tissues, cells' ability to detoxify peroxides and normalized the redox status.

This series of studies highlighted a new hypothesis: PN leads to a cysteine deficiency that can be prevented by glutathione supplementation that is used as procysteine (38). One consequence of the veracity of this hypothesis is a suboptimal protein synthesis in PN individuals, especially in growing children. Therefore, the objective of the study was to demonstrate that glutathione supplementation promotes protein synthesis in a growing animal model of PN, such as the one-month-old guinea pig.

4. Methods

Experimental design

Twenty nine one-month-old Hartley male guinea pigs, weighing 288 ± 3 g (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) were housed in the animal facility for 5 days for acclimation (23-25°C; 12:12hr light:dark). The PN animals were anesthetized (87 mg/kg ketamine + 13 mg/kg xylazine and isoflurane gas for maintenance) to insert a catheter in the external jugular vein (11-14, 21). During the first two days after surgery, the animals received 0.9% (w/v) NaCl containing 1 IU/ml of heparin i.v. and the infusion rate was gradually increased on the first days from 0.5 to 1.5 ml/hr. During this time, the animals were fed with regular guinea pig food. Animals having recovered 90% of their initial weight were included in the 5-days PN protocol.

Animals were divided into 4 groups:

- 1) Control: animals of the same age but without any manipulation and fed with regular guinea pig food.
- 2) PN: animals were exclusively fed by PN, having free access to tap water. The PN was compounded with: 10% (w/v) glucose, 2% (w/v) amino acids (Primene, Baxter, Toronto, Canada), 2% (w/v) Intralipid 20% (Fresenius Kabi, Mississauga, ON, Canada), electrolytes, 1% (v/v) multivitamin preparation (Multi-12, Sandoz, Boucherville, QC, Canada), and 1U / ml heparin. PN solutions were freshly prepared daily and administered at an average rate of 129 ml / kg / day.
- 3) PN+10 μ M GSSG: animals receiving PN enriched with 10 μ M GSSG (Sandoz, Boucherville, QC, Canada).
- 4) PN+100 μ M GSSG: animals receiving PN enriched with 100 μ M GSSG.

After 5 days, the animals were sacrificed, blood and gastrocnemius muscles were collected, processed and kept at -80°C until the assays.

In accordance with the principles of the Canadian Council on Animal Care (CCAC), the Institutional Committee for Good Practice with Animals in Research of the CHU Sainte-Justine approved the protocol.

Determinations

- Peroxide concentrations in the PN solutions were assessed by the FOX assay based on the colorimetric reaction (560 nm) between xylenol-orange and ferric iron generated after oxidation of ferrous iron by peroxides. The measurements were made after a 3 h-incubation and H₂O₂ was used for the standard curve (5, 14, 22).
- For determination of GSH and GSSG, immediately after sampling, the muscles were homogenized in 5 volumes of 5% (w/v) metaphosphoric acid, centrifuged for 4 minutes at 7200 g. GSH and GSSG in supernatants were measured by capillary electrophoresis / UV according to the previously published method (11-14) while protein levels were measured in pellets by the Bradford method. The redox potential was calculated using the Nernst equation.
- The low concentration of glutathione in the plasma (μ M) does not allow its determination by capillary electrophoresis. An enzymatic method based on the reduction of DTNB by GSH, generating a compound absorbing at 412 nm, was used (23,24). The system includes regeneration of GSSG to GSH by glutathione reductase + NADPH. Therefore, the increased absorbance over time is proportional to the level of GSH+GSSG in the sample. The standard curve was performed with GSSG and the results were reported as total glutathione expressed in GSH equivalent (1 GSSG = 2 GSH).
- The protein synthesis rate was evaluated by measuring the incorporation of ³H-L-leucine (25, 26) into the muscle on days 3 and 4, where 100 μ Ci of ³H-L-leucine was added to the PN. The last day of infusion was without radioisotope. Five hundred mg of muscle were homogenized with 5 volumes of 5% (w/v) metaphosphoric acid and centrifuged at 13 000 g / 20 minutes /

4°C. Radioactivity (dpm) was measured by scintillation in the supernatant and the pellet (protein fraction).

- Determination of haemoglobin and plasma urea values made possible to assess the animal overall health such as anemia, dehydration and starvation. The plasma concentration of urea was measured by the method of Fearon (27) reviewed by Rahmatullah & Boyde (28). The method was based on a colorimetric reaction (520 nm) following the interaction between urea and diacetyl monoxime in the presence of thiosemicarbazide. The results were extrapolated from the standard curve generated with urea. The measuring of haemoglobin level was based on the oxidation of haemoglobin to methaemoglobin in the presence of ferricyanide. The complex absorbs at 540 nm. A commercial kit (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was used.

Statistical analyses

All data are presented as mean \pm s.e.m. The groups were compared by ANOVA, using orthogonal comparisons, after verifying homoscedasticity by Bartlett Chi². Pearson's correlations were used to quantify the weight gain of animals over of the 5-days duration of the experiment. Significant threshold was set at 0.05.

5. Results

Animal model

As expected, the three PN groups were contaminated with $272 \pm 14 \mu\text{M}$ peroxides (6,14).

Over the course of PN, two animals were removed from the experiment due to a jugular catheter occlusion. Therefore, 27 animals are included in this study. Bodyweight (**Figure 1**) of the control group increased by 14% during the 5-days experiment (including all animals of this group, $y = 9.7 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 352\text{g}$; $r^2 = 0.64$, $p < 0.01$) while it decreased over time in the PN group (including all animals of this group, $y = -3.6 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 329\text{g}$; $r^2 = 0.18$, $p < 0.01$), in PN+10 μM GSSG group (including all animals of this group, $y = -3.8 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 334\text{g}$; $r^2 = 0.18$, $p < 0.02$) and in PN+100 μM GSSG group (including all animals of this group, $y = -3.9 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 308\text{g}$; $r^2 = 0.17$, $p = 0.067$). The slopes and the 6% decrease over time were similar between all the PN groups. Bodyweight at day 0 differed between control group and PN groups ($F_{(1,21)} = 15.3$, $p < 0.01$), they were similar between PN and PN+10 μM GSSG group ($F_{(1,21)} = 0.8$), and higher than animals from the PN+100 μM GSSG group ($F_{(1,21)} = 11.2$, $p < 0.01$).

Comparisons of haemoglobin and plasma urea values made possible to assess the animal overall health such as anemia, dehydration and starvation. There was a significant interaction between groups and days of experimentation ($F_{(1,42)} > 6.3$, $p < 0.05$) for the haemoglobin values (**Table 1**). Therefore, data were re analyzed according to the groups. Haemoglobin concentrations were 8% higher on the fifth day of experiment compared with the first day in the PN group ($F_{(1,42)} = 5.7$, $p < 0.05$). This increase over time was corrected by adding GSSG in PN. Indeed there was no significant difference between days neither in PN + GSSG groups, nor in control group ($F_{(1,42)} < 3.5$). Plasma urea concentrations on the last day of experiment (**Figure 4**), were not significantly different between groups ($F_{(1,23)} < 0.4$).

Oxidative stress

GSSG concentrations in muscle were higher ($F_{(1,23)} = 12.5$, $p < 0.01$) in the PN group (**Figure 2B**). There was no significant difference between the PN+GSSG groups and control group ($F_{(1,23)} < 3.7$). GSH concentrations (**Figure 2A**) were similar between groups ($F_{(1,23)} < 1.7$). The ratio of GSSG over total glutathione (GSH+GSSG) (**Figure 2D**) did not differ between the PN+GSSG groups and the control group ($F_{(1,23)} < 3.7$) whereas this ratio was 2-fold higher in the PN group ($F_{(1,23)} = 9.0$, $p < 0.01$) compared to the control group. The redox potential of glutathione (**Figure 2C**) was the lowest in the control group ($F_{(1,23)} = 9.4$, $p < 0.01$). There was no significant difference between the PN and PN+GSSG groups ($F_{(1,23)} < 1.3$).

The addition of GSSG to PN did no change the plasma glutathione concentrations (**Figure 3**) ($F_{(1,23)} < 0.4$). All were lower than the control group ($F_{(1,23)} = 32.3$, $p < 0.01$).

Protein synthesis

Concentration of protein in plasma (**Figure 4**) was lower in the PN group ($F_{(1,23)} = 11.1$, $p < 0.01$). The values were similar between PN+GSSG groups and control group ($F_{(1,23)} < 0.7$). Although protein concentrations per gram of muscle were similar between groups (111 ± 2 mg/g, $F_{(1,23)} < 0.1$), incorporation of radioactive ^3H -L-leucine in the protein fraction of the muscle (**Figure 5**) was higher in the PN+GSSG groups than in the PN group ($F_{(1,16)} = 6.8$, $p < 0.05$).

6. Discussion

One of the main findings of the study is that in addition to the prevention of oxidative stress, glutathione supplementation increases the rate of protein synthesis. These results are in agreement with the hypothesis of a limited availability of cysteine for the metabolism of individuals under PN. Indeed, the combined actions of peroxides contaminating PN (6) and the poor stability of cysteine in PN solutions (29) could lead, once infused, to a decreased protein synthesis and lower antioxidant capacity.

In this guinea pig model, five consecutive days of PN causes a weight loss of 6% in all animals in the PN groups compared with the 14% weight gain in the enterally fed control animals. These observations are consistent with a previous study using a guinea pig PN model (21). A nutritive deprivation would have led to catabolism. Urea is the main nitrogenous product of protein degradation. Thus, the absence of difference between the urea plasma concentrations between the groups does not support the presence of catabolism. In addition, equal levels of protein per gram of muscle tissue in all groups, including control, suggest that PN animals did not suffer from inadequate caloric intake leading to higher protein catabolism. Despite apparently adequate caloric intake, reflected by hemoglobin levels and normal plasma urea concentrations, this lack of weight gain could be explained by the qualitative and quantitative differences in nutrient intake between PN groups and control group, or by the impact of the nutrient delivery route on growth. Other possibility is that this lack of growth in PN animals is explained, at least in part, by partial inability to synthesize *de novo* proteins. The low levels of glutathione reported in the blood of premature infants (19) as well as in children under chronic PN (5), support the hypothesis of suboptimal availability of cysteine.

In the PN solution, cysteine is oxidized as a result of interaction with dissolved oxygen and peroxides (22) producing sulfenylcysteine and cystine (31). The disulfide form of cysteine is unstable in solution and precipitates rapidly (29). *In vivo*, methionine is converted into cysteine through the transsulfuration pathway. However, the peroxides generated in PN inhibit the methionine adenosyltransferase (11,32), the first enzyme in this cascade, resulting in a drop in the level of glutathione in the blood, lung and liver (11-13). Consequently, in neonatal animals, the detoxification of peroxides by glutathione peroxidases is reduced. This allows the accumulation of GSSG, a marker of the presence of peroxides (15). PN supplementation with glutathione prevented the loss of GSH and accumulation of GSSG in these animals (13).

In plasma, both GSH and GSSG are equally used by the γ -glutamyltranspeptidase that transfers their γ -glutamyl fraction to another circulating amino acid (33). The two newly formed dipeptides, γ -glutamyl-amino acid and the remaining cysteinylglycine, are taken up by the cells, where dipeptidases release the amino acids. Since the availability of cysteine is a limiting step for glutathione synthesis (34), increasing its intracellular concentration promotes glutathione synthesis and the activity of glutathione peroxidases. However, in cells, the affinity of the cysteinyl-tRNA synthetase for cysteine ($K_m = 1\text{-}20 \mu\text{M}$ (35)) is about 30-fold higher than that of γ -glutamylcysteine ligase ($K_m = 200\text{-}350 \mu\text{M}$ (34,36)), the first enzyme for GSH synthesis. It could be expected that in a growing individual, such as one-month-old guinea pig, in addition to reducing peroxide-induced oxidative stress, the administration of GSSG enriched PN promotes protein synthesis. This was confirmed by 1) the 57% higher incorporation of ^3H -L-leucine into the protein fraction of the gastrocnemius muscle, and 2) the prevention of the 13% loss of plasma protein.

The lack of prevention on the redox potential could be related to a sub-optimal dose of GSSG used. Indeed, the improvement of the level of GSH in the cells seems to be sufficient to neutralize the peroxides but not to increase GSH level. Since the redox potential is related to the ratio of the squared GSH concentration on GSSG (Nernst equation), the variation in GSH may be too small to observe a modification of redox. This weak change in GSH could be caused by a greater affinity of cysteine for protein synthesis. The presumptive suboptimal GSSG dose is also corroborated by the lack of normalization of glutathione in the plasma, which could be explained by the fact that once glutathione enters the plasma, it is fully used. The lack of a dose-response effect between the two concentrations of GSSG used underlines that the protocol could be not optimal. The choice of 10 μ M GSSG was dictated by previous studies (13) realized in newborn guinea pigs where the supplementation of PN with this GSSG concentration prevented plasma loss of glutathione, lung oxidative stress and lung histological perturbations. The concentration of the amino acid preparation used here, Primene, generated a PN solution containing 320 μ M methionine and 314 μ M cysteine, according to the manufacturer. Our data suggest that these amino acids concentrations are not sufficient to maintain adequate protein and glutathione synthesis. As discussed above, the presence of peroxides limits the transformation of methionine into cysteine, while cysteine is known as instable in solution. The addition of 10 to 100 μ M GSSG in the PN provided benefits. Another limitation was the short duration of the procedure. A positive effect of glutathione supplement on weight gain may have required a longer PN duration. In this study, despite only 5 days with possibly suboptimal glutathione dose, proof of concept is made: the PN-induced cysteine deficiency can be prevented, at least in part, by adding GSSG to PN. Beyond these limitations, the study suggests that PN must be systematically enriched with procysteine molecules. GSSG is the molecule of choice because it

can compensate the metabolic defect caused by peroxides, and its addition seems safe in view of its rapid urinary elimination, plasma half-life of 15 minutes (37), preventing an abnormal accumulation. However, further animal studies should determine the best dose of GSSG to use to prevent oxidative stress and allow optimal protein synthesis and weight gain.

7. References

- 1 Worthington P, Balint J, Bechtold M, Bingham A, Chan LN, Durfee S, Jevonn AK, Malone A, Mascarenhas M, Robinson DT, Holcombe B. When is parenteral nutrition appropriate? *Journal Parenteral Enteral Nutrition JPEN* 41:324-377; 2017.
- 2 Davila J, Konrad D. Metabolic complications of home parenteral nutrition. *Nutr Clin Pract* 32:753-768; 2017.
- 3 Lavoie JC, Chessex P. Total parenteral nutrition and oxidant stress in the newborn: a review. *FRBM* submitted October 25th 2018
- 4 Chessex P, Watson C, Kaczala G, Rouleau T, Lavoie ME, Friel J, Lavoie JC. Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants. *Free Radic Biol Med* 49:1380-1386; 2010.
- 5 Lavoie JC, Rebeuh J, Herzog D, Faure C, Rouleau T. Oxidative stress in children on long-term parenteral nutrition. *J Hum Nutr Food Sci* 5: 1110; 2017.
- 6 Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 99: E61-E70; 1997.
- 7 Helbock HJ, Motchnik PA, Ames BN. Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants. *Pediatrics* 91:83-88; 1993.
- 8 Neuzil J, Darlow BA, Inder TE, Sluis KB, Winterbourn CC, Stocker R. Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: Potential toxicity of routine parenteral feeding. *J Pediatr.* 126:785-790; 1995.

- 9 Brawley V, Bathia, J, Karp B. Hydrogen peroxide generation in a model pediatric parenteral amino acid solution. *Clin Sci* 85:709-712; 1993.
- 10 Shattuck KE, Bhatia J, Grinnell C, Rassin DK. The effects of light exposure on the in vitro hepatic response to an amino acid-vitamin solution. *J Parenter Enteral Nutr* 19:398-402; 1995.
- 11 Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Inhibition of hepatic methionine adenosyltransferase by peroxides contaminating parenteral nutrition leads to a lower level of glutathione in newborn guinea pigs. *Free Radic Biol Med* 53:2250-2255; 2012
- 12 Elremaly W, Mohamed I, Mialet-Marty T, Rouleau T, Lavoie JC. Ascorbylperoxide from parenteral nutrition induces oxidized redox potential of glutathione and loss of alveoli in newborn guinea pig lungs. *Redox Biol* 2:725-731; 2014
- 13 Elremaly, W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Adding glutathione to parenteral nutrition prevents alveolar loss in newborn Guinea pig. *Free Radic Biol Med* 87:274-281; 2015
- 14 Lavoie JC, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J, Chessex P. Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radic Biol Med* 45:572-577; 2008.
- 15 Lavoie JC, Tremblay A. Sex-specificity of oxidative stress in newborn leading to a personalized antioxidant nutritive strategy. *Antioxidants (Basel)* 2018 Mar 27;7(4). pii: E49. doi: 10.3390/antiox7040049.
- 16 Islam JY, Keller RL, Aschner JL, Hartert TV, Moore PE. Understanding the Short- and Long-Term Respiratory Outcomes of Prematurity and Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J*

- Respir Crit Care Med 192:134-156; 2015.
- 17 Mosca F, Colnaghi M, Fumagalli M. BPD: old and new problems. *J Matern Fetal Neonatal Med* 24:80-82; 2011.
 - 18 Baraldi E, Carraro S, Filippone M. Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome. *Early Hum Dev* 85:S1-S3; 2009.
 - 19 Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition is associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely preterm infants. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 41:1023-1029; 2017.
 - 20 Mohamed I, Elremaly W, Rouleau T, Lavoie JC. Oxygen and parenteral nutrition - two main oxidants - for extremely preterm infants: 'it all adds up. *J Neonatal Perinatal Med* 8:189-197; 2015.
 - 21 Lu CJ, Redmond D, Baggs RB, Schechter A, Gasiewicz TA. Growth and hepatic composition in the guinea pig after long-term parenteral hyperalimentation. *Am J Physiol* 251: R388-97, 1986
 - 22 Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853-856; 1991.
 - 23 Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502-522; 1969.

- 24 Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-212; 1980.
- 25 Darmaun, D., Mauras, N. Use of stable isotopes to assess protein and amino acid metabolism in children and adolescents: a brief review. *Horm Res*, 64 Suppl 3, 32-37; 2005.
- 26 Prefontaine, A., Calderone, A., Dupuis, J. Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation. *Can J Physiol Pharmacol*, 86(6), 337-342; 2008.
- 27 Fearon, W. R. The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *Biochem J*, 33(6), 902-907; 1939.
- 28 Rahmatullah M, Boyde TR. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation. *Clin Chim Acta* 107:3-9; 1980.
- 29 Hoffer LJ. Parenteral nutrition: amino acids. *Nutrients* 9:257-266; 2017.
- 30 Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: Implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 43:601-606; 1998.
- 31 Majmudar JD, Konopko AM, Labby KJ, Tom CTMB, Crellin JE, Prakash A, Martin BR. Harnessing redox cross-reactivity to profile distinct cysteine modifications. *J Am Chem Soc* 138:1852-1859; 2016.
- 32 Elremaly W, Mohamed I, Rouleau T, Lavoie JC. Impact of glutathione supplementation of parenteral nutrition on hepatic methionine adenosyltransferase activity. *Redox Biol* 8:18-23; 2016.

- 33 Cotgreave IA, Schuppe-Koistinen I. A role for gamma-glutamyl transpeptidase in the transport of cysteine into human endothelial cells: relationship to intracellular glutathione. *Biochem. Biophys. Acta* 1223:375-382;1994.
- 34 Shi MM, Iwamoto T, Forman HJ. γ -Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol*, 267: L414-L421; 1994.
- 35 Liu C, Gamper H, Shtivelband S, Hauenstein S, Perona JJ, Hou YM. Kinetic quality control of anticodon recognition by a eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* 367:1063-1078; 2007.
- 36 Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268:19675-19680; 1993.
- 37 Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH. High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Eur J Clin Invest* 21:103-110; 1991.
- 38 Meister, A., Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 1988. 263(33): p. 17205-8.

	PN	PN+10 μ M GSSG	PN+100 μ M GSSG	C
Hb at d0 (g/L)	198 \pm 3	188 \pm 4	199 \pm 7	192 \pm 3
Hb at d5 (g/L)	213 \pm 4 *	199 \pm 5	209 \pm 5	191 \pm 3
Urea at d5 (mg/L)	34.7 \pm 1.3	34.3 \pm 2.9	36.0 \pm 1.5	33.8 \pm 1.0

Table 1. Haemoglobin and plasma urea concentrations. Hb: haemoglobin measured at the first (d0) and last (d5) day of experimentation. Urea measured in plasma at the last day of experimentation. Statistical analyses revealed that Hb concentration was higher at d5 compared to d0 in PN groups. There was no significant difference between days neither in PN groups enriched with GSSG nor in control group. Urea concentrations were not significantly different between groups. Mean \pm s.e.m, n= 4-8 per group; *: p<0.05.

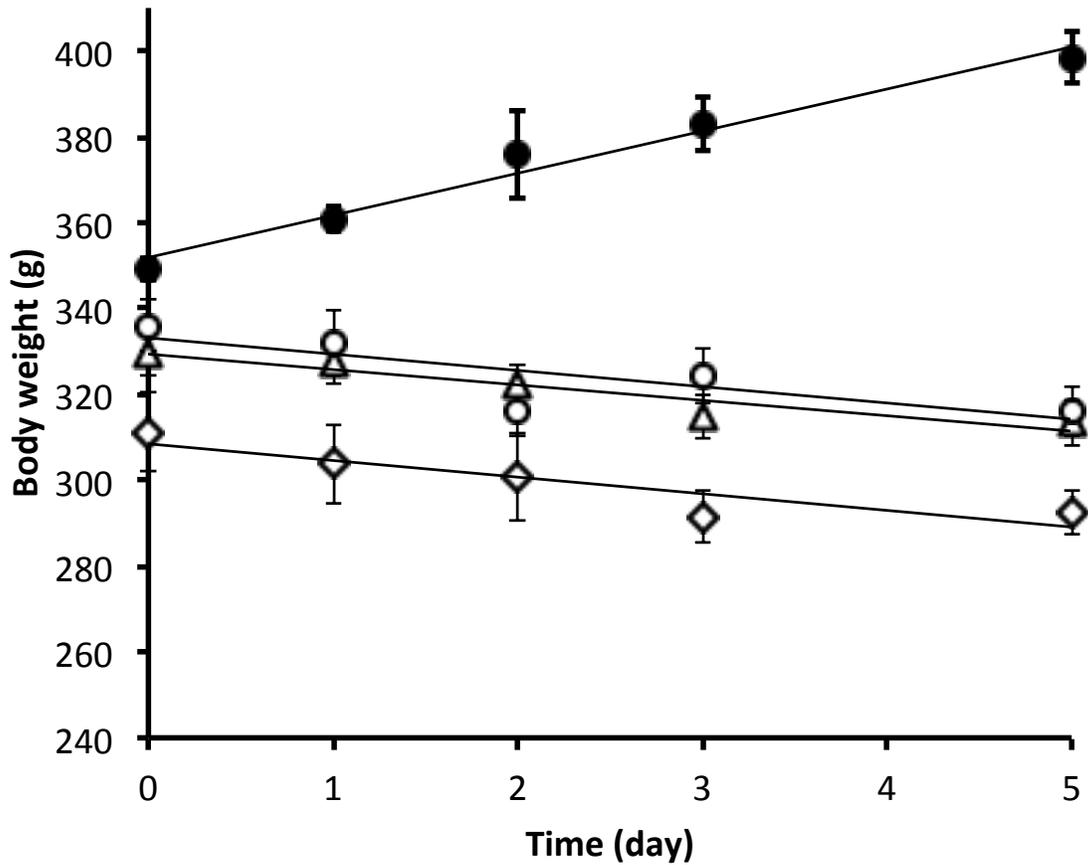


Figure 1: Body weight over the duration of the experiment. Data are presented as mean \pm s.e.m. (n=4-8 per group per day). The equations of the linear curves were obtained by taking into account all the animals of the concerned group. Dark circle: control; $y = 9.7 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 352\text{g}$, $r^2 = 0.64$, $p < 0.01$. Open triangle: PN; $y = -3.6 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 329\text{g}$, $r^2 = 0.18$, $p < 0.01$. Open circle: PN + 10 μM GSSG; $y = -3.8 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 334\text{g}$, $r^2 = 0.18$, $p < 0.02$. Open diamond: PN + 100 μM GSSG; $y = -3.9 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1} + 308\text{g}$, $r^2 = 0.17$, $p = 0.067$.

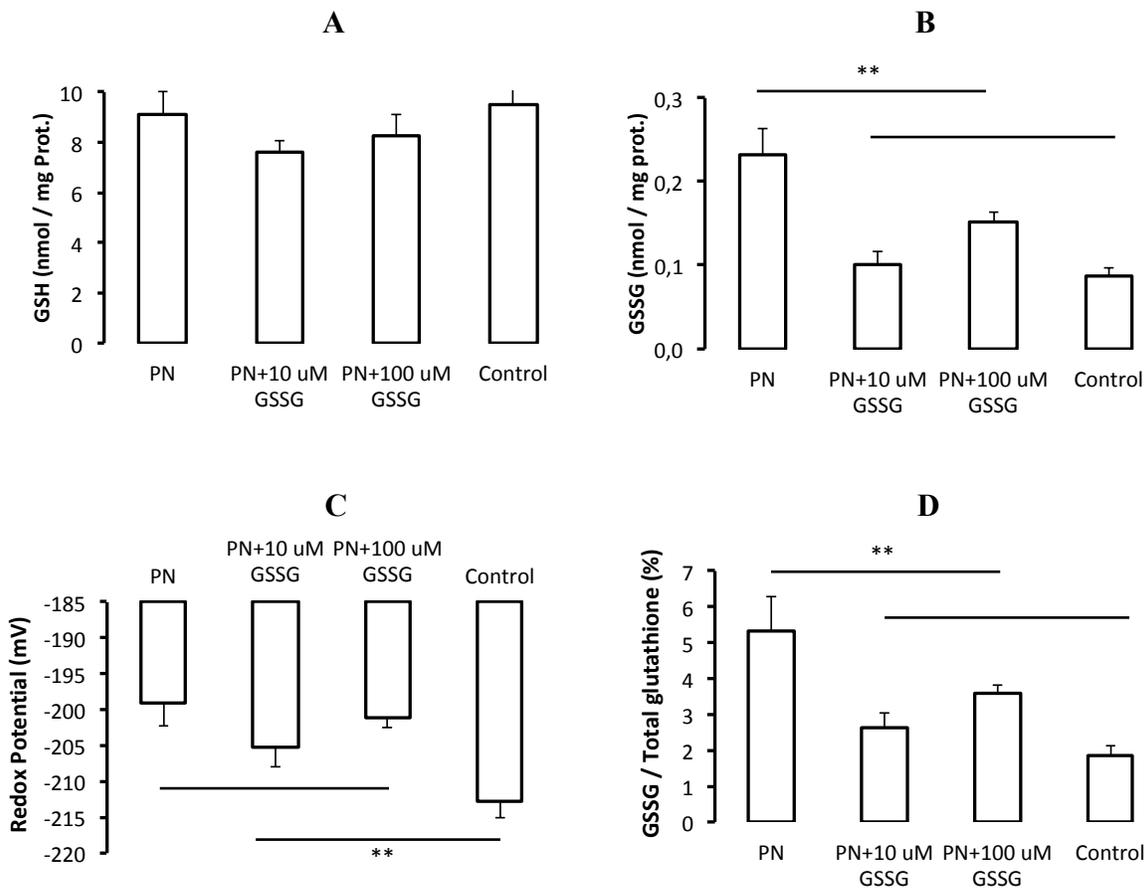


Figure 2: Oxidative stress markers associated with the presence of peroxides, in the gastrocnemius muscle. PN: Parenteral nutrition; PN+ 10 or 100 μ M GSSG: PN enriched with 10 or 100 μ M GSSG; Control: animals without manipulation. A: There was no difference in GSH levels between the four groups. B: GSSG values were the highest ($p < 0.01$) in the PN group. This increase was prevented by the GSSG supplementation (comparatively to control). C: All PN groups presented an oxidized redox compared to control ($p < 0.01$). D: the ratio of GSSG on total glutathione (GSH+GSSG) was the highest ($p < 0.01$) in the PN group. This increase was prevented by the GSSG supplementation; the values were similar to those measured in the control group. Mean \pm s.e.m (n= 4-8 per group); **: $p < 0.01$

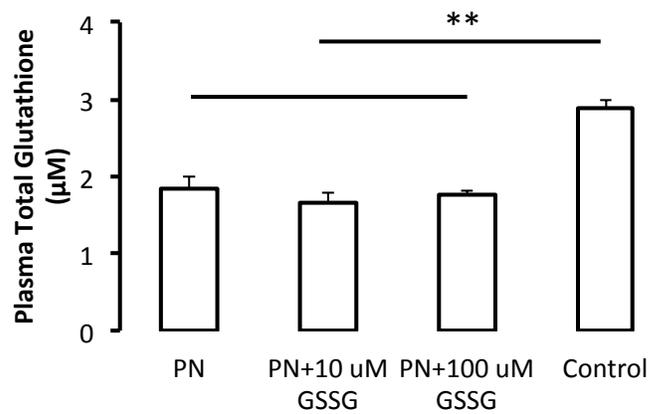


Figure 3: Plasma Total Glutathione. PN: Parenteral nutrition; PN+ 10 or 100 µM GSSG: PN enriched with 10 or 100 µM GSSG; Control: animals without manipulation. Total glutathione (GSH+GSSG) expressed as GSH equivalent was lower in PN animals ($p < 0.01$). The glutathione supplement (GSSG) standardized this level (similar to the control). Mean \pm s.e.m (n= 4-8 per group); **: $p < 0.01$

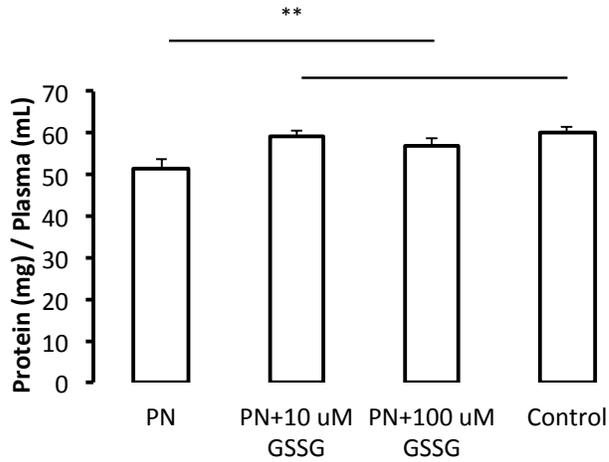


Figure 4: Plasma protein levels. PN: Parenteral nutrition; PN+ 10 or 100 μ M GSSG: PN enriched with 10 or 100 μ M GSSG; Control: animals without manipulation. The lower plasma concentration of protein observed in PN group ($p < 0.01$) was corrected by GSSG enrichment (similar to the control). Mean \pm s.e.m (n= 4-8 per group); **: $p < 0.01$

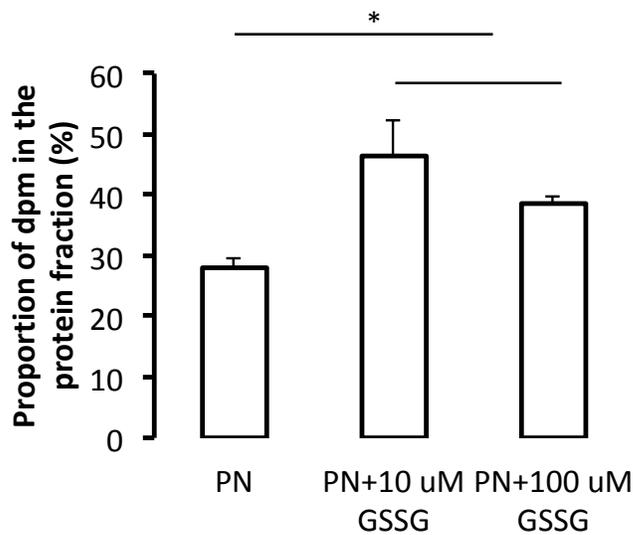


Figure 5: Incorporation of $^3\text{H-L-leucine}$ in gastrocnemius muscle. PN: Parenteral nutrition; PN+ 10 or 100 μM GSSG: PN enriched with 10 or 100 μM GSSG. The level of protein synthesis was quantified with the incorporation level of a radioactive isotope-labeled amino acid. $^3\text{H-L-leucine}$ was introduced in PN on the third and fourth days of the protocol. After centrifugation of acid-treated muscle, the pellet was considered as the protein fraction. Compared to PN group, the incorporation was higher ($p < 0.05$) in animals which received GSSG with their PN. Mean \pm s.e.m (n= 4-8 per group); *: $p < 0.05$

3. Résultats supplémentaires

Les autres résultats sur le stress oxydant et la synthèse protéique (non présentés dans le manuscrit) sont présentés ici en vue d'enrichir la discussion générale. Les figures suivantes montrent les concentrations de GSH, de GSSG et de potentiel redox du glutathion pour le foie et le poumon. Les résultats sur la synthèse protéique sont tous présentés à la figure 14 et l'incorporation de leucine tritiée dans la fraction protéique hépatique à la figure 15..

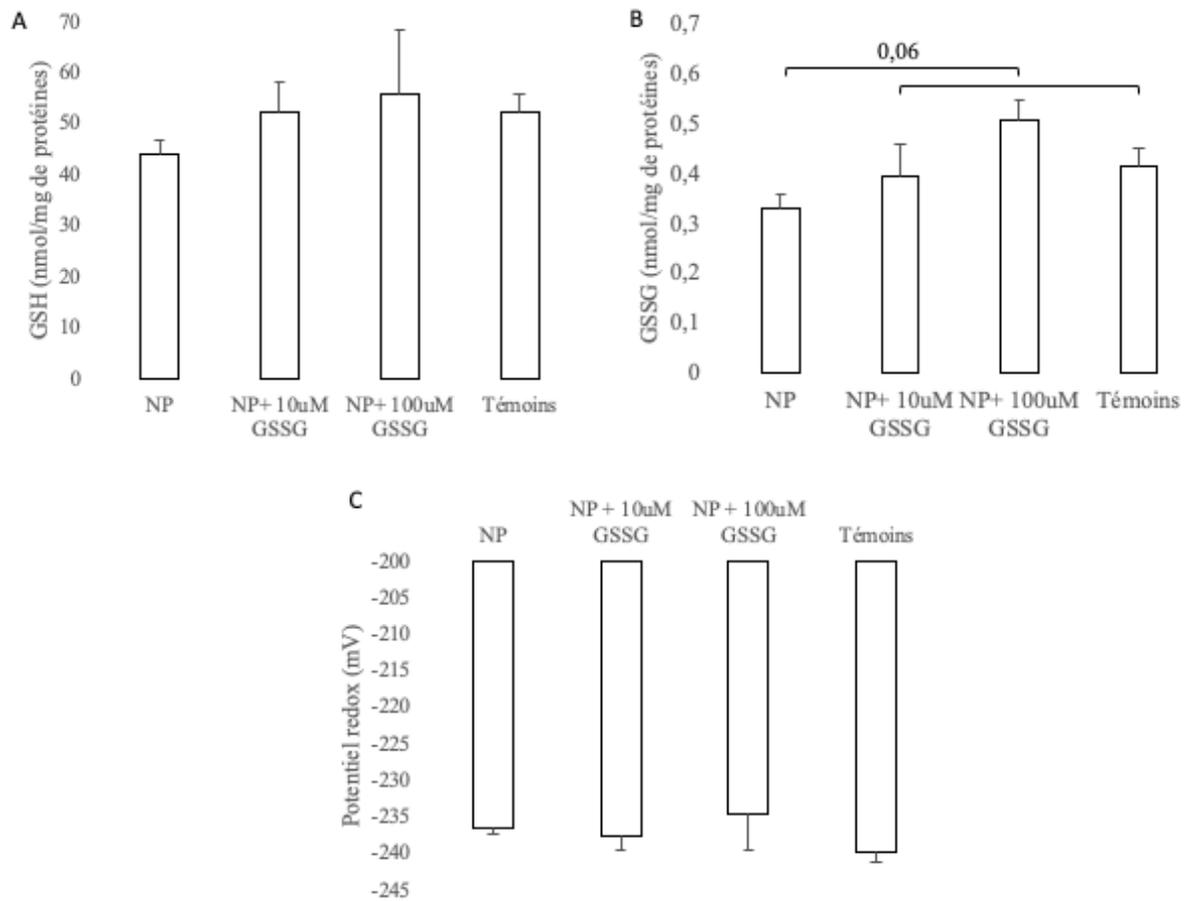


Figure 12. Niveaux de GSH, de GSSG et du potentiel redox du glutathion hépatique, selon la diète. NP : nutrition parentérale, NP + 10 μ M GSSG : nutrition parentérale enrichie de 10 μ M de glutathion, NP + 100 μ M GSSG : nutrition parentérale enrichie de 100 μ M de glutathion. (A) Les niveaux de GSH sont similaires entre les groupes; (B) Les taux de GSSG semblent plus bas chez les NP, mais non significatifs ($p > 0,05$). (C) Le potentiel redox est similaire pour tous les groupes. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m., $n = 4-8$.

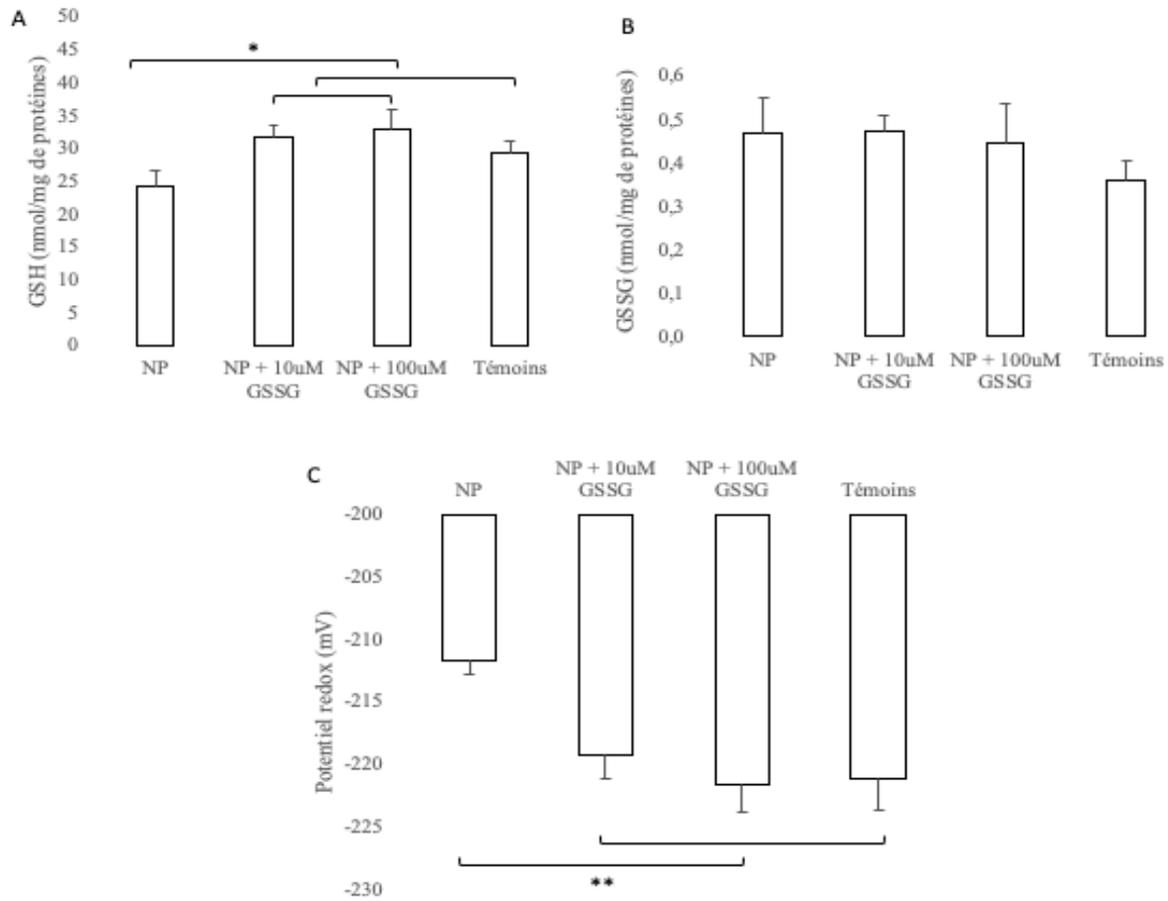


Figure 13. Niveaux de GSH, de GSSG et du potentiel redox du glutathion pulmonaire, selon la diète. Témoins : aucun traitement, NP : nutrition parentérale, NP + 10 μ M GSSG : nutrition parentérale enrichie de 10 μ M de glutathion, NP + 100 μ M GSSG : nutrition parentérale enrichie de 100 μ M de glutathion. La NP a eu un effet oxydant significatif sur le système pulmonaire. (A) Les niveaux de GSH sont significativement réduits par la NP, mais normalisés par l'ajout de glutathion. (B) Les niveaux de GSSG ne sont pas différents parmi les groupes (C) Le potentiel redox est plus oxydé lorsque la NP n'est pas enrichie en glutathion, comparativement aux témoins. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m., n= 4-8. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$

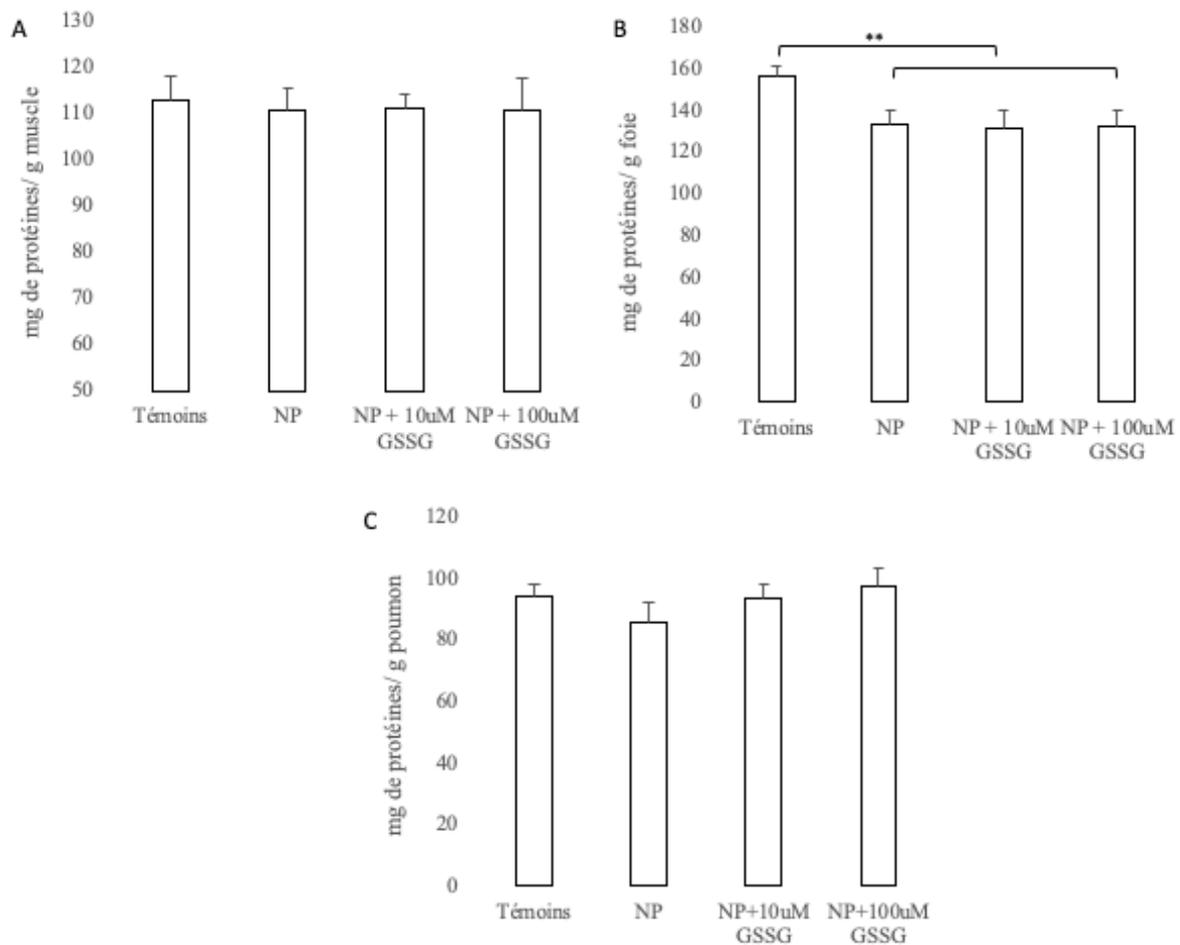


Figure 14. Effet de la nutrition parentérale enrichie ou non en glutathion sur la teneur en protéines dans chaque tissu. Témoins : aucun traitement, NP : nutrition parentérale, NP + 10 µM GSSG : nutrition parentérale enrichie de 10 µM de glutathion, NP + 100 µM GSSG : nutrition parentérale enrichie de 100 µM de glutathion. (A) La nutrition parentérale n'a pas affecté la quantité de protéines au muscle, comparativement aux témoins. (B) Au foie, la NP a significativement réduit la teneur en protéines de 8%. (C) La nutrition parentérale n'a pas affecté la quantité de protéines au poumon, comparativement aux témoins. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm s.e.m., n= 4-8; ** = p<0,01.

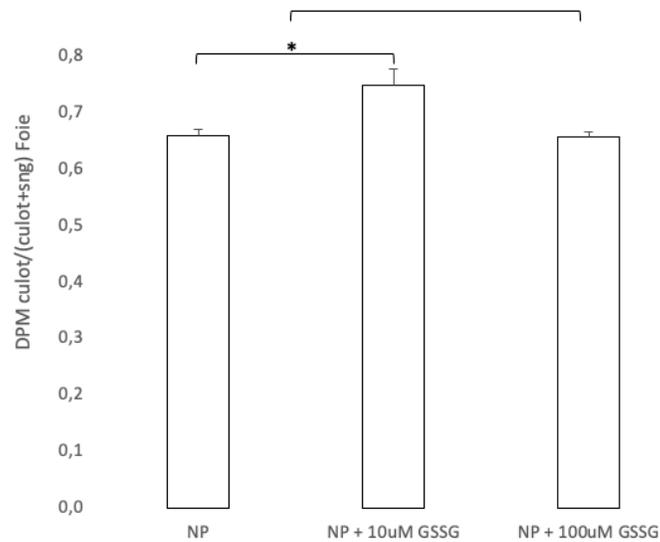


Figure 15. Ratio d'incorporation de leucine tritiée (^3H) dans le foie. La radioactivité est mesurée en DPM (désintégrations par minute) et le ratio par le total de DPM contenu dans les protéines (culot) sur le total de DPM contenu dans le tissu. NP : nutrition parentérale, NP + 10uM GSSG : nutrition parentérale enrichie de 10 uM de glutathion, NP + 100uM GSSG : nutrition parentérale enrichie de 100 uM de glutathion. Comparativement à la NP seule, le ratio est augmenté de 13% par l'ajout de 10uM de glutathion. La dose de 100 uM de GSSG n'a apporté aucun changement à ce niveau. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n= 4-8. *: $p < 0,05$.

Discussion

La discussion suivante se veut générale et complémentaire à celle du manuscrit. Dans un premier temps, elle reprend les concepts décrits dans le manuscrit tout en étant enrichie de l'interprétation des résultats supplémentaires. Dans un deuxième temps, elle fait état des forces et limites du projet global.

1. Effet systémique de la supplémentation en GSSG

La NP est un traitement essentiel qui aide les enfants à croître, lorsque l'alimentation entérale est partiellement ou totalement inefficace. Malgré le travail rigoureux d'équipes nutritionnelles multidisciplinaires, le succès et à la poursuite de ce mode de nutrition à long terme est fréquemment associé à l'apparition d'effets secondaires délétères [17, 107]. Dans le manuscrit, nous avons d'abord exposé l'effet délétère de la NP sur la synthèse protéique par l'évolution du poids des animaux (**figure 1** du manuscrit). Le poids moyen des animaux sous NP a diminué au cours de l'expérience, et ce, malgré un apport calorique moyen suffisant pour soutenir la synthèse protéique, du moins pendant les 3 derniers jours (figure 9). Bien que la perte de poids des animaux sous NP soit significative, ces observations sont en accord avec les derniers résultats publiés sur ce modèle à notre connaissance [81]. Dans cette étude, le même ralentissement de croissance fut observé dans les premiers jours sous NP, et ce, malgré un apport calorique nettement supérieur. De plus, chez notre modèle, une corrélation significative entre l'apport calorique et la prise de poids n'a pu être établie ($r^2 = 0,048$). La perte de poids significative observée durant les premiers jours sous NP peut s'expliquer par d'autres facteurs, tels qu'un apport calorique insuffisant, le vide des intestins de matières fécales ou une lipolyse accentuée pour pallier le déficit calorique. La détermination de l'urée plasmatique devient alors

pertinente. Une concentration élevée aurait suggéré un catabolisme accru de protéines, caractéristique d'un apport calorique inadéquat. De plus, ce catabolisme élevé aurait été mesurable dans un organe comme le muscle par une teneur protéique diminuée. Pourtant, cela n'a pas été le cas pour notre modèle au terme de la NP, chez qui la concentration en urée plasmatique et en protéines dans le tissu musculaire n'était pas différente de celle des témoins (**tableau I** du manuscrit et figure 14, A). En somme, cela suggère à nouveau que les animaux sous NP n'ont pas souffert d'un apport calorique insuffisant conduisant à un catabolisme protéique anormal. Un apport calorique inadéquat ne peut donc expliquer qu'en partie l'arrêt de la prise de poids des animaux sous NP \pm GSSG. Ce ralentissement de croissance observé s'explique alors, du moins partiellement, par la diminution de la synthèse protéique *de novo*, et c'est ce dont les principaux résultats présentés dans le manuscrit font état : l'altération de la synthèse protéique semble être effectivement induite par une déficience en cystéine provoquée par le stress oxydant inhérent de la NP.

En plus de la réduction de la concentration en protéines plasmatiques, l'impact des peroxydes contaminants la NP est également observable par les faibles concentrations de glutathion total plasmatique (**figure 3** du manuscrit). Comme le glutathion constitue un réservoir majeur de cystéine, ces faibles concentrations plasmatiques font en sorte que l'apport en cystéine aux tissus environnants est limité, entre autres dans un organe où la synthèse protéique est importante, tel que le muscle. L'ajout d'une molécule procystéine à la NP comme le GSSG a permis d'augmenter de plus de 50% l'incorporation d'un acide aminé essentiel (leucine tritiée) aux protéines musculaires (**figure 5** du manuscrit). Bien que nous n'ayons pu mesurer une différence significative dans la teneur en protéines dans le muscle (figure 14, A), cela ne veut pas dire qu'il

n'y en ait pas. La période de 5 jours sous NP semblent insuffisante pour induire une perte significative dans la teneur protéique totale au muscle. Toutefois, nous expliquons difficilement cette absence de différence puisque l'incorporation de leucine tritiée semble augmentée par l'ajout de GSSG à la NP (**figure 5** du manuscrit). C'est pourquoi nous insistons sur le fait que d'autres facteurs sont certainement impliqués. Comme souhaité au départ, un temps supplémentaire sous NP (d'au moins une semaine) nous aurait permis d'observer un regain du poids corporel et donc l'apparition d'un effet du GSSG dans la NP, ainsi qu'une explication plausible à ce phénomène. Aussi, si l'augmentation d'incorporation d'acides aminés en protéines s'est faite dans les derniers jours sous NP, alors qu'il n'y avait pas de réduction significative de la teneur en protéines musculaires et au même moment où l'apport calorique fut adéquat, cela expliquerait peut-être l'absence d'un effet sur cette teneur.

Malgré cela, ces observations nous ont permis de conclure que chez un individu en croissance, l'ajout de GSSG à la NP en tant que procystéine est une méthode efficace et sécuritaire pour prévenir les effets délétères des peroxydes en plus de favoriser, du moins en partie, la synthèse protéique dans un organe comme le muscle.

Les résultats supplémentaires présentés à la suite du manuscrit permettent d'enrichir la discussion vers l'effet systémique de la NP sur le métabolisme, et du potentiel bénéfique tout aussi systémique de l'ajout de GSSG à cette dernière. En effet, l'impact de l'ajout de GSSG à la NP peut être mesuré dans d'autres organes où la synthèse protéique est importante, notamment le foie. Bien que l'impact oxydant de la NP sur le potentiel redox du glutathion hépatique n'ait pas été significatif, pas du moins par nos mesures de stress oxydant choisies (figure 12), cela s'est illustré d'une autre façon. Comme mentionné précédemment, la cystéine est l'acide aminé limitant à la synthèse du glutathion [71]. Lors d'un mode de nutrition entérale,

l'apport nutritionnel (par la veine porte) est la première voie d'obtention de la cystéine pour le foie, tandis que la transsulfuration à partir de la méthionine constitue la deuxième voie [73]. Dans la NP, la concentration en cystéine est faible ou parfois nulle dans certaines formulations (tableau I). En conséquence, sous NP, la voie de la transsulfuration est possiblement la principale source d'apport en cystéine pour la synthèse de glutathion, du moins pour la cellule hépatique. Or, chez le cochon d'Inde néonatal, les peroxydes limitent cette voie par l'inhibition de MAT et induisent une réduction de la concentration en GSH [53]. Bien qu'il n'y ait pas de diminution significative du niveau de GSH hépatique chez notre modèle plus âgé (figure 12, A), ce niveau n'est peut-être pas suffisant pour enrichir les tissus en GSH par le plasma, tel que présenté dans le manuscrit (**figure 3** du manuscrit). Chez notre modèle, l'incapacité du foie à exporter le GSH dans le plasma à un niveau adéquat (comparable aux témoins) pourrait expliquer partiellement la concentration réduite de GSH pulmonaire observée chez les animaux sous NP (figure 13, A). Le retour de la concentration de GSH au niveau des témoins par l'ajout de GSSG valide le concept que ce supplément mime la relâche hépatique de GSH, et est alors immédiatement capté par les cellules en tant que procystéine. De plus, l'incorporation de leucine tritiée au foie (figure 15), augmentée 13% par l'ajout de 10 μ M de glutathion semblent favoriser la synthèse de protéines exportées au plasma (**figure 4** manuscrit). Cela est en accord avec la cinétique enzymatique présentée à la section *Hypothèse et objectifs de l'étude*. Par-contre, l'absence de dose réponse suggère que l'ajout de 100 μ M de GSSG n'est pas optimal et que d'autres mécanismes sont en cause. Toutefois, ces observations renforcent la notion que les bénéfices de la supplémentation en GSSG dans la NP sont systémiques.

À ce sujet, le poumon est connu comme étant sensible à l'administration chronique de peroxydes par la NP, du moins chez un modèle animal néonatal [53, 86, 88]. Chez notre modèle, l'effet pro-oxydant des peroxydes s'est traduit par un potentiel redox pulmonaire plus oxydé. (figure 13, C). De plus, une réduction du niveau de GSH menant à ce redox plus oxydé valide le concept que l'apport en cystéine est limité (figure 13, A). L'effet délétère des peroxydes sur le système pulmonaire de notre modèle animal plus âgé suggère à nouveau que ce concept ne se limite peut-être pas aux individus d'âge néonatal.

2. Forces et limites du projet

La démarche scientifique menant à l'établissement du modèle est décrite dans la partie Méthodologie de ce mémoire. Notre objectif de départ fut de maintenir une NP chez ce modèle pendant 2 semaines. La capacité du cochon d'Inde de laboratoire à subir et à récupérer adéquatement d'une intervention chirurgicale comme celle présentée dans ce mémoire est excellente (tableau III). La difficulté réside toutefois au niveau du maintien de la NP sur plusieurs jours. La multitude de problèmes rencontrés à toutes les étapes expérimentales ont fait en sorte que la durée totale de la NP fut réduite de 14 à 7 jours (5 jours exclusivement sous NP). Cela explique peut-être pourquoi peu d'équipes de recherche ont tenté l'expérience. Le délai de quelques jours avant l'atteinte d'un plateau calorique combiné à la courte durée de l'expérience a contribué au fait que les animaux témoins ont potentiellement consommé une quantité plus importante de kcal/kg de poids/jour que les animaux NP. L'atteinte minimale d'un débit de 180 ml/kg/jour avant le début de la NP exclusive vers un débit final de 225 ml/kg/jour aurait permis aux animaux NP de consommer une quantité de calories plus importante et donc relever cette

limite. La raison pour laquelle le débit ne fut pas atteint dès le départ est due en bonne partie à l'enflure au site de chirurgie. Pour certains animaux, l'augmentation progressive du débit pendant la période de récupération créa de l'œdème au niveau du cou, faisant en sorte que l'atteinte du débit optimal fut retardée au courant de la NP (figure 9). Cela suggère que chez ces animaux, le positionnement du cathéter est très important. Par conséquent, en plus des repères anatomiques et de l'injection de salin hépariné suite à l'insertion, la confirmation du positionnement du cathéter par une technique d'imagerie serait bénéfique.

Chez notre modèle, des marqueurs d'état de santé tels que l'hémoglobine et l'urée plasmatique ont été déterminés et évalués afin de savoir si la composition de la NP pouvait provoquer des perturbations métaboliques. Comme attendu, ces marqueurs n'ont pas varié dans le temps chez les témoins. En revanche, même si les valeurs demeurent dans l'intervalle de référence pour cette espèce (données de Charles River), l'augmentation de l'hémoglobine chez plusieurs animaux soulève un questionnement. Ces résultats pourraient être interprétés comme un signe de déshydratation, mais nous ne pouvons le confirmer puisque la prise d'eau n'a pas été quantifiée. Par conséquent, la méthode expérimentale pourrait être optimisée à cette fin. Néanmoins, cela soulève également un questionnement sur l'impact du stress oxydant induit par la NP sur le système pulmonaire et le transport d'oxygène dans les globules rouges. D'autres déterminations telles que l'index d'alvéolarisation ou la détermination de marqueurs de peroxydation seraient utiles afin de comprendre les mécanismes impliqués [58].

Nous ne pouvons mettre de côté les limites de notre protocole expérimental, notamment la durée relativement courte sous NP. Toutefois, avoir mené ce protocole à terme nous a permis de

constater que 5 jours de NP suffisent pour induire des effets significatifs. À l'instar de l'humain, les mécanismes impliqués peuvent être complexes, mais là réside la force de notre modèle animal chez qui l'impact de la NP fut systémique.

Effectivement, les différents effets observés entre les organes concernant la synthèse protéique et le stress oxydant justifient l'utilisation du cochon d'Inde comme modèle animal en croissance. D'autres équipes de recherche s'intéressant à la NP pourraient bénéficier de l'utilisation de ce modèle notamment grâce à cette spécificité de l'impact de la NP sur différents organes [108]. Même si la supplémentation de la NP de 10 à 100 μM de GSSG semble procurer des effets bénéfiques systémiques, la dose optimale de GSSG reste à déterminer. L'absence surprenante d'un effet dose-réponse suggère que la dose choisie est non optimale, ou non suffisante et que d'autres mécanismes métaboliques impliquant l'utilisation du GSH/GSSG peuvent être en cause. D'autres études avec ce modèle et une dose GSSG au-delà de 100 μM permettraient d'en apprendre davantage sur le métabolisme du glutathion, notamment au niveau hépatique [79].

À cet égard, cela nous permettrait de mieux interpréter le niveau réduit de protéines hépatiques observé chez tous les animaux sous NP, suggérant à nouveau une utilisation altérée de la cystéine et des autres acides aminés apportés par la voie parentérale (figure 14, B). La détermination des concentrations en glycogène, en lipides ou en eau permettrait d'identifier les mécanismes sous-jacents. Des coupes histologiques permettraient également de déceler la présence de stéatose [57].

Conclusion

Tout ce travail de maîtrise n'aurait pu se faire sans le succès de l'établissement d'une NP chez notre modèle animal. Bien que la technique de chirurgie soit complexe, elle demeure réalisable et reproductible pour un technicien expérimenté. Ainsi, plusieurs chercheurs s'intéressant à la nutrition parentérale et ses effets à court, moyen et long terme pourraient bénéficier de l'expertise de notre laboratoire de recherche et des méthodes présentées dans le manuscrit et dans ce mémoire.

De plus, les résultats ont permis de valider les effets délétères de la NP sur la synthèse protéique globale. Conjointement à d'autres travaux de recherche, cela indique que la NP, tel qu'administré aujourd'hui, requiert un raffinement.

Toutefois, les résultats présentés dans ce mémoire appuient d'autres résultats prometteurs concernant l'utilisation du glutathion en tant que supplément. En effet, la supplémentation sous forme réduite du glutathion (GSH) a fait l'objet d'études sur plusieurs troubles métaboliques n'ayant pas recours à la NP : allant du déficit de croissance chez les enfants atteints de fibrose kystique [109], au traitement de certains cancers [110], et à la prévention de la cachexie [111].

Néanmoins, beaucoup de travaux de recherche restent à accomplir, à savoir quelle est la dose optimale de GSSG à utiliser en NP, ou quel serait l'effet d'une supplémentation en GSSG sur d'autres désordres métaboliques. Quoi qu'il en soit, si le raffinement de la NP chez l'enfant passe par l'ajout de GSSG, cela aura le potentiel d'être bénéfique, et ce, à tout âge de la vie.

Bibliographie

1. Thibault, R. and C. Pichard, *Parenteral nutrition*. World Rev Nutr Diet, 2013. **105**: p. 59-68.
2. Nehra, D., E.M. Fallon, and M. Puder, *The prevention and treatment of intestinal failure-associated liver disease in neonates and children*. Surg Clin North Am, 2011. **91**(3): p. 543-63.
3. 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.
4. Patel, P. and J. Bhatia, *Total parenteral nutrition for the very low birth weight infant*. Semin Fetal Neonatal Med, 2017. **22**(1): p. 2-7.
5. Messing, B., et al., *Prognosis of patients with nonmalignant chronic intestinal failure receiving long-term home parenteral nutrition*. Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 1005-10.
6. Fullerton, B.S., C.R. Hong, and T. Jaksic, *Long-term outcomes of pediatric intestinal failure*. Semin Pediatr Surg, 2017. **26**(5): p. 328-335.
7. Pichler, J., et al., *Growth and bone health in pediatric intestinal failure patients receiving long-term parenteral nutrition*. Am J Clin Nutr, 2013. **97**(6): p. 1260-9.
8. D'Antiga, L. and O. Goulet, *Intestinal failure in children: the European view*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013. **56**(2): p. 118-26.
9. Kappus, M., et al., *Intestinal Failure: New Definition and Clinical Implications*. Curr Gastroenterol Rep, 2016. **18**(9): p. 48.
10. Leonberg, B.L., et al., *Long-term growth and development in children after home parental nutrition*. J Pediatr, 1998. **132**(3 Pt 1): p. 461-6.
11. Gonzalez, H.F., et al., *Nutrition and immunological status in long-term follow up of children with short bowel syndrome*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2005. **29**(3): p. 186-91.
12. Abi Nader, E., et al., *Outcome of home parenteral nutrition in 251 children over a 14-y period: report of a single center*. Am J Clin Nutr, 2016. **103**(5): p. 1327-36.
13. Georgeson, K.E. and C.W. Breaux, Jr., *Outcome and intestinal adaptation in neonatal short-bowel syndrome*. J Pediatr Surg, 1992. **27**(3): p. 344-8; discussion 348-50.
14. Festen, S., et al., *Excellent long-term outcome for survivors of apple peel atresia*. J Pediatr Surg, 2002. **37**(1): p. 61-5.
15. Colomb, V., et al., *Long-term outcome of children receiving home parenteral nutrition: a 20-year single-center experience in 302 patients*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **44**(3): p. 347-53.
16. Stawny, M., et al., *Pharmaceutical point of view on parenteral nutrition*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 415310.

17. Johnson, T. and E. Sexton, *Managing children and adolescents on parenteral nutrition: Challenges for the nutritional support team*. Proc Nutr Soc, 2006. **65**(3): p. 217-21.
18. Kolacek, S., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR guidelines on pediatric parenteral nutrition: Venous access*. Clin Nutr, 2018.
19. Pittiruti, M., et al., *ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: central venous catheters (access, care, diagnosis and therapy of complications)*. Clin Nutr, 2009. **28**(4): p. 365-77.
20. Joosten, K., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR guidelines on pediatric parenteral nutrition: Energy*. Clin Nutr, 2018.
21. Shulman, R.J. and S. Phillips, *Parenteral nutrition in infants and children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003. **36**(5): p. 587-607.
22. Bronsky, J., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Vitamins*. Clin Nutr, 2018.
23. Mihatsch, W., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Calcium, phosphorus and magnesium*. Clin Nutr, 2018.
24. Van Gossum, A., et al., *ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: gastroenterology*. Clin Nutr, 2009. **28**(4): p. 415-27.
25. Hill, S., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Home parenteral nutrition*. Clin Nutr, 2018.
26. Kalhan, S.C. and I. Kilic, *Carbohydrate as nutrient in the infant and child: range of acceptable intake*. Eur J Clin Nutr, 1999. **53 Suppl 1**: p. S94-100.
27. Mesotten, D., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR guidelines on pediatric parenteral nutrition: Carbohydrates*. Clin Nutr, 2018.
28. Lapillonne, A., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Lipids*. Clin Nutr, 2018.
29. Burrin, D.G., et al., *Impact of new-generation lipid emulsions on cellular mechanisms of parenteral nutrition-associated liver disease*. Adv Nutr, 2014. **5**(1): p. 82-91.
30. Zhang, T., et al., *Effect of a fish oil-based lipid emulsion on intestinal failure-associated liver disease in children*. Eur J Clin Nutr, 2018. **72**(10): p. 1364-1372.
31. Hoffer, L.J., *Parenteral Nutrition: Amino Acids*. Nutrients, 2017. **9**(3).
32. Vina, J., et al., *L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency*. Am J Clin Nutr, 1995. **61**(5): p. 1067-9.
33. Wlodarczyk K., Z.G., Shevchuk Y.M., Leson C.L., *Total Parenteral Nutrition Practices in Canadian Neonatal and Pediatric Care Units: Results of a Survey*. The Canadian Journal of Hospital Pharmacy, 2002. **55**(4): p. 254-261.
34. Goulet, O. and F. Ruemmele, *Causes and management of intestinal failure in children*. Gastroenterology, 2006. **130**(2 Suppl 1): p. S16-28.
35. Carter, B.A. and R.J. Shulman, *Mechanisms of disease: update on the molecular etiology and fundamentals of parenteral nutrition associated cholestasis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007. **4**(5): p. 277-87.
36. Kelly, D.A., *Preventing parenteral nutrition liver disease*. Early Hum Dev, 2010. **86**(11): p. 683-7.

37. Yeh, S.L., W.J. Chen, and P.C. Huang, *Effects of fish oil and safflower oil emulsions on diet-induced hepatic steatosis in rats receiving total parenteral nutrition*. Clin Nutr, 1996. **15**(2): p. 80-3.
38. Clayton, P.T., P. Whitfield, and K. Iyer, *The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parenteral nutrition*. Nutrition, 1998. **14**(1): p. 158-64.
39. Diamanti, A., et al., *How does long-term parenteral nutrition impact the bone mineral status of children with intestinal failure?* J Bone Miner Metab, 2010. **28**(3): p. 351-8.
40. Klein, G.L., *Metabolic bone disease of total parenteral nutrition*. Nutrition, 1998. **14**(1): p. 149-52.
41. Ferrone, M. and M. Geraci, *A review of the relationship between parenteral nutrition and metabolic bone disease*. Nutr Clin Pract, 2007. **22**(3): p. 329-39.
42. Colomb, V., et al., *Prepubertal growth in children with long-term parenteral nutrition*. Horm Res, 2002. **58 Suppl 1**: p. 2-6.
43. 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.
44. 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.
45. Brawley, V., J. Bhatia, and W.B. Karp, *Hydrogen peroxide generation in a model paediatric parenteral amino acid solution*. Clin Sci (Lond), 1993. **85**(6): p. 709-12.
46. 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.
47. Lipinski, B., *Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease*. Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 809696.
48. Lavoie, J.C., et al., *Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(9): p. 1297-303.
49. Ahmad, S., et al., *Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine*. Front Biosci (Schol Ed), 2017. **9**: p. 71-87.
50. Davies, M.J., *The oxidative environment and protein damage*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
51. Brosnan, J.T. and M.E. Brosnan, *The sulfur-containing amino acids: an overview*. J Nutr, 2006. **136**(6 Suppl): p. 1636S-1640S.
52. Cortese-Krott, M.M., et al., *The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine*. Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(10): p. 684-712.
53. Elremaly, W., T. Rouleau, and J.C. Lavoie, *Inhibition of hepatic methionine adenosyltransferase by peroxides contaminating parenteral nutrition leads to a lower level of glutathione in newborn Guinea pigs*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(12): p. 2250-5.
54. Avila, M.A., et al., *Specific interaction of methionine adenosyltransferase with free radicals*. Biofactors, 1998. **8**(1-2): p. 27-32.

55. Markham, G.D. and M.A. Pajares, *Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(4): p. 636-48.
56. Sanchez-Gongora, E., et al., *Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical*. FASEB J, 1997. **11**(12): p. 1013-9.
57. 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.
58. Elremaly, W., et al., *Adding glutathione to parenteral nutrition prevents alveolar loss in newborn Guinea pig*. Free Radic Biol Med, 2015. **87**: p. 274-81.
59. Kleiber, N., et al., *Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition*. Pediatr Res, 2010. **68**(3): p. 188-92.
60. Mohamed, I., et al., *Ascorbylperoxide Contaminating Parenteral Nutrition Is Associated With Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Preterm Infants*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2017. **41**(6): p. 1023-1029.
61. Lavoie, J.C.R., J.; Herzog, D.; Faure, C.; Rouleau, T, *Oxidative Stress in Children on Long-Term Parenteral Nutrition*. Journal of Human Nutrition & Food Science, 2017. **2**(5).
62. Pavarino, E.C., Russo, A., Galbiatti, A. L. S., Almeida, W. P., Bertollo, E. M. G., *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*. Glutathione: Biosynthesis and Mechanisms of Action, ed. N. Labrou, Flemetakis, E. 2013: Nova Science Publishers, Incorporated. 360.
63. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
64. Ballatori, N., et al., *Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases*. Biol Chem, 2009. **390**(3): p. 191-214.
65. Lushchak, V.I., *Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions*. J Amino Acids, 2012. **2012**: p. 736837.
66. Wu, G., et al., *Glutathione metabolism and its implications for health*. J Nutr, 2004. **134**(3): p. 489-92.
67. Meister, A., *Glutathione metabolism and its selective modification*. J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17205-8.
68. Meister, A., *Glutathione, ascorbate, and cellular protection*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1969s-1975s.
69. Lyons, J., et al., *Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5071-6.
70. Chung, T.K., M.A. Funk, and D.H. Baker, *L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate as a cysteine precursor: efficacy for growth and hepatic glutathione synthesis in chicks and rats*. J Nutr, 1990. **120**(2): p. 158-65.
71. Griffith, O.W., *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 922-35.

72. Shi, M.M., T. Iwamoto, and H.J. Forman, *gamma-Glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 1): p. L414-21.
73. Mosharov, E., M.R. Cranford, and R. Banerjee, *The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes*. Biochemistry, 2000. **39**(42): p. 13005-11.
74. van Goudoever, J.B., et al., *ESPGHAN/ESPEN/ESPR guidelines on pediatric parenteral nutrition: Amino acids*. Clin Nutr, 2018.
75. Liu, C., et al., *Kinetic quality control of anticodon recognition by a eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase*. J Mol Biol, 2007. **367**(4): p. 1063-78.
76. Huang, C.S., et al., *Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19675-80.
77. Dudrick, S.J., et al., *Long-term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance*. Surgery, 1968. **64**(1): p. 134-42.
78. Lippert, A.C., et al., *Total parenteral nutrition in clinically normal cats*. J Am Vet Med Assoc, 1989. **194**(5): p. 669-76.
79. Hong, L., J. Wu, and W. Cai, *Glutathione decreased parenteral nutrition-induced hepatocyte injury in infant rabbits*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2007. **31**(3): p. 199-204.
80. Jain, A.K., et al., *Validating hyperbilirubinemia and gut mucosal atrophy with a novel ultramobile ambulatory total parenteral nutrition piglet model*. Nutr Res, 2015. **35**(2): p. 169-74.
81. Lu, C.J., et al., *Growth and hepatic composition in the guinea pig after long-term parenteral hyperalimentation*. Am J Physiol, 1986. **251**(2 Pt 2): p. R388-97.
82. Lavoie, J.C., M. Spalinger, and P. Chessex, *Glutathione synthetic activity in the lungs in newborn guinea pigs*. Lung, 1999. **177**(1): p. 1-7.
83. Lavoie, J.C., et al., *Shielding parenteral multivitamins from light increases vitamin A and E concentration in lung of newborn guinea pigs*. Clin Nutr, 2007. **26**(3): p. 341-7.
84. Committee on Animal Nutrition, B.o.A., National Research Council, *Nutrients Requirements of the Guinea Pig*. Fourth ed. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, ed. J. Overton. 1995, N.W. Washington D.C.: Natrional Academy Press, National Academy of Science. 192.
85. Clemons, D.J., Seeman, J. L., *The laboratory guinea pig*. Second ed. The laboratory animal pocket reference series, ed. M.A. Suckow. Vol. 3. 2011, NY, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group. 154.
86. Lavoie, J.C., et al., *Impact of SMOFLipid on Pulmonary Alveolar Development in Newborn Guinea Pigs*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2018.
87. Sokol, R.J., et al., *Hepatic oxidant injury and glutathione depletion during total parenteral nutrition in weanling rats*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. G691-700.
88. Elremaly, W., et al., *Ascorbylperoxide from parenteral nutrition induces an increase of redox potential of glutathione and loss of alveoli in newborn guinea pig lungs*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 725-31.

89. Soghier, L.M. and L.P. Brion, *Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD004869.
90. Moukarzel, A.A., et al., *Growth retardation in children receiving long-term total parenteral nutrition: effects of ornithine alpha-ketoglutarate*. Am J Clin Nutr, 1994. **60**(3): p. 408-13.
91. Yeligar, S.M., et al., *Glutathione attenuates ethanol-induced alveolar macrophage oxidative stress and dysfunction by downregulating NADPH oxidases*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(5): p. L429-41.
92. Aebi, S., R. Assereto, and B.H. Lauterburg, *High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine*. Eur J Clin Invest, 1991. **21**(1): p. 103-10.
93. Kern, J.K., et al., *A clinical trial of glutathione supplementation in autism spectrum disorders*. Med Sci Monit, 2011. **17**(12): p. CR677-82.
94. Brown, L.A., et al., *Glutathione supplements protect preterm rabbits from oxidative lung injury*. Am J Physiol, 1996. **270**(3 Pt 1): p. L446-51.
95. Radde, G.R., et al., *Evaluation of anaesthetic regimens in guineapigs*. Lab Anim, 1996. **30**(3): p. 220-7.
96. Sloan, R.C., et al., *High doses of ketamine-xylazine anesthesia reduce cardiac ischemia-reperfusion injury in guinea pigs*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011. **50**(3): p. 349-54.
97. Jiang, Z.Y., A.C. Woollard, and S.P. Wolff, *Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method*. Lipids, 1991. **26**(10): p. 853-6.
98. Lavoie, J.C. and P. Chessex, *Development of glutathione synthesis and gamma-glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(6): p. 994-1001.
99. Prefontaine, A., A. Calderone, and J. Dupuis, *Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation*. Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(6): p. 337-42.
100. Darmaun, D. and N. Mauras, *Use of stable isotopes to assess protein and amino acid metabolism in children and adolescents: a brief review*. Horm Res, 2005. **64 Suppl 3**: p. 32-7.
101. Yoshizawa, F., *Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(2): p. 417-22.
102. Kenessey, A. and K. Ojamaa, *Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20666-72.
103. Curbo, S., et al., *Is trichloroacetic acid an insufficient sample quencher of redox reactions?* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(7): p. 795-9.
104. Schoen, I. and M. Solomon, *Control of blood haemoglobin determinations by a simple effective method*. J Clin Pathol, 1962. **15**: p. 44-6.
105. Fearon, W.R., *The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline*. Biochem J, 1939. **33**(6): p. 902-7.

106. Rahmatullah, M. and T.R. Boyde, *Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation*. Clin Chim Acta, 1980. **107**(1-2): p. 3-9.
107. Worthington, P.H. and K.A. Gilbert, *Parenteral nutrition: risks, complications, and management*. J Infus Nurs, 2012. **35**(1): p. 52-64.
108. Ng, K., et al., *Vitamin E in New-Generation Lipid Emulsions Protects Against Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease in Parenteral Nutrition-Fed Preterm Pigs*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2016. **40**(5): p. 656-71.
109. Visca, A., et al., *Oral reduced L-glutathione improves growth in pediatric cystic fibrosis patients*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2015. **60**(6): p. 802-10.
110. Cascinu, S., et al., *Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(16): p. 3478-83.
111. Mueller, T.C., et al., *Cachexia and pancreatic cancer: are there treatment options?* World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9361-73.