

Université de Montréal

**La transplantation d'hépatocytes chez le rat Long Evans
Cinnamon, modèle animal de la maladie de Wilson**

Par
Kim Vo

Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
En Sciences Biomédicales

Novembre 2006

© Kim Vo, 2006

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**La transplantation d'hépatocytes chez le rat Long Evans Cinnamon,
modèle animal de la maladie de Wilson**

Présenté par :
Kim Vo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Daloze (président-rapporteur)
Fernando Alvarez (directeur de recherche)
Michel Lallier (codirecteur)
Michel Duval (membre du jury)

Résumé

La maladie de Wilson est une maladie héréditaire due à un déficit du transporteur du cuivre, l'ATP7B. Cette maladie se présente sous forme d'insuffisance hépatique aiguë ou chronique, pour lesquels le traitement médical actuel consiste en l'administration d'agents chélateurs, ce qui ne résulte cependant pas en une guérison complète de la maladie. La transplantation orthotopique du foie est le seul traitement définitif actuellement, avec tous les désavantages qu'elle comporte. Un traitement alternatif à cette option est donc souhaitable. Cette étude porte sur la faisabilité de la transplantation d'hépatocytes chez le modèle animal de la maladie de Wilson, le rat Long Evans Cinnamon (LEC), avec pour buts d'en déterminer la sécurité et l'efficacité tant sur le plan clinique (amélioration de la survie, prévention de l'hépatite) que pathologique. Douze rats LEC ont reçu une injection intrasplénique de $2,6 \times 10^5$ – $3,6 \times 10^7$ hépatocytes prélevés chez des rats donneurs de souche LE. Ils ont été suivis durant 6 mois puis sacrifiés. Ils ont ensuite été comparés à un groupe contrôle de douze autres rats LEC. Aucune différence significative n'a été notée au niveau du poids, du bilan hépatique et des concentrations de cuivre biliaire et hépatique. Cependant, une amélioration de l'activité oxydase de la céruloplasmine post-transplantation a été démontrée chez le groupe de rats transplantés ($49,6 \pm 31,5$ versus $8,9 \pm 11,7$). Les rats transplantés ont aussi eu une amélioration sur tous les critères histologiques étudiés. Enfin, l'ARNm de l'atp7b a été retrouvé chez 58% des rats transplantés avec un taux d'expression de $11,9\% \pm 13,6$ par rapport à un rat LE normal. L'immunohistochimie a quant à elle démontré la présence de l'atp7b chez tous les rats transplantés. Les résultats obtenus sont considérés favorables à ce traitement alternatif, et indiquent que la transplantation d'hépatocytes est une technique sécuritaire qui peut

contribuer à renverser le processus pathologique en cours dans la maladie de Wilson.

Mots clés : rat Long Evans Cinnamon, Wilson, transplantation d'hépatocytes, ATP7B, maladie métabolique

Abstract

Wilson's disease (WD) is a hereditary metabolic disease caused by a deficiency of copper-transporting ATP7B, resulting in copper accumulating to toxic levels in the liver. Its manifestations range from acute or chronic hepatic insufficiency to fulminant liver failure. The mainstay of therapy is the use of chelating agents. However selected patients may also require orthotopic liver transplantation (OLT), an invasive and complex procedure with life-long implications. Hepatocyte transplantation is an appealing alternative to OLT. Its safety and efficacy were evaluated in the animal model of WD, the Long Evans Cinnamon (LEC) rat. Twelve LEC rats received an intrasplenic injection of $2,6 \times 10^5$ – $3,6 \times 10^7$ hepatocytes obtained from LE donor rats. They were followed for 6 months before sacrifice. They were then compared to a control group of twelve rats. No difference was found when comparing their weights, biochemical parameters such as liver function tests and bilirubin, as well as their biliary and hepatic copper concentrations. However, the ceruloplasmin oxydase activity was improved in the transplanted rats ($49,6 \pm 31,5$ versus $8,9 \pm 11,7$). After sacrifice, histologic evaluation and demonstration of *atp7b* mRNA in the recipient liver were performed. There was evidence of histological improvement and *atp7b* mRNA was found in 58% of transplanted rats with an expression of $11,9\% \pm 13,6$ when compared to a normal LE rat. Evidence of successful engraftment of the transplanted cells was found in every transplanted rat using the technique of immunohistochemistry. These encouraging results are in accordance with previous studies on hepatocyte transplantation in the LEC rat. Its application to the human clinical setting is the next step, as it has already been tried in other metabolic liver diseases.

Key words: Wilson, ATP7B, hepatocyte transplantation, LEC rat, metabolic disease

TABLES DES MATIÈRES

Identification du jury	page II
Résumé	page III
Abstract	page V
Table des matières	page VII
Liste des tableaux	page XI
Liste des figures	page XII
Liste des abréviations	page XIII
Chapitre 1: Introduction	
1.1 La maladie de Wilson	page 1
1.1.1 Historique	
1.1.2 Epidémiologie	
1.1.3 Manifestations cliniques	

1.1.4 Diagnostic

1.1.4.1 Biopsie hépatique

1.1.4.2 Dosage sanguin de la céruloplasmine

1.1.4.3 Cuivre urinaire

1.1.4.4 Cuivre sérique

1.1.4.5 Examens radiologiques

1.1.5 Traitement

1.1.5.1 Traitement médical

1.1.5.2 Transplantation hépatique

1.2 Pathophysiologie de la maladie de Wilson page 10

1.2.1 Métabolisme du cuivre

1.2.2 Gène ATP7B

1.3 Modèle animal de la maladie de Wilson page 16

1.3.1 Le rat LEC

1.3.2 Données sur le rat LEC et similarités avec la
maladie de Wilson

1.3.3 Particularités du rat LEC non retrouvées dans la
maladie de Wilson

1.3.4 Gène atp7b

1.4	Buts de l'étude	page 21
1.5	Méthodologie	page 21
1.5.1	Maintien d'une cohorte de rats LEC au laboratoire animal de l'Hôpital Ste-Justine	
1.5.2	Groupes de rats	
1.5.3	Génotypage des rats LEC	
1.5.3.1	Extraction d'ADN	
1.5.3.2	PCR	
1.5.4	Tests de fonction hépatique	
1.5.5	Mesure de l'activité oxydase de la céruloplasmine	
1.5.6	Prélèvement des hépatocytes sur le rat donneur	
1.5.7	Isolement des hépatocytes	
1.5.8	Détermination de la viabilité cellulaire et du décompte cellulaire	
1.5.9	Hépatectomie partielle	
1.5.10	Tansplantation intrasplénique des hépatocytes	
1.5.11	Sacrifice des rats et canulation du cholédoque	
1.5.12	Mesure de la concentration du cuivre hépatique et biliaire	
1.5.13	Histologie	
1.5.14	Détection de l'ARNm du gène atp7b	
1.5.14.1	Extraction de l'ARN	
1.5.14.2	RT-PCR	
1.5.15	Immunohistochimie	
1.5.16	Analyses statistiques	

Chapitre 2 : Résultats page 40

2.1 Données du groupe 1

2.2 Poids

2.3 Tests de fonction hépatique

2.4 Activité oxydase de la céruloplasmine

2.5 Concentration du cuivre biliaire et hépatique

2.6 Survie des rats

2.7 Histologie

2.8 Détection de l'ARNm de l'atp7b

2.9 Immunohistochimie

Chapitre 3 : Discussion page 55

Chapitre 4 : Conclusions page 74

Références bibliographiques page 75

Annexes page 85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Tests diagnostiques	page 5
Tableau II	: Données portant sur les 12 rats transplantés (groupe 1)	page 41
Tableau III	: Hépatites biochimiques et cliniques	page 43
Tableau IV	: Activité oxydase de la céruloplasmine des rats transplantés (groupe 1) : pré et post-transplantation	page 45
Tableau V	: Activité oxydase de la céruloplasmine des rats contrôles (groupe 2)	page 46
Tableau VI	: Activité oxydase de la céruloplasmine des rats contrôles (groupe 3)	page 46
Tableau VII	: Concentration du cuivre biliaire & hépatique au moment du sacrifice	page 47
Tableau VIII	: Histologie des foies	page 49
Tableau IX	: Taux d'expression du gène atp7b (groupe 1)	page 52

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Métabolisme du cuivre	page 12
Figure 2: ATP7B	page 13
Figure 3 : Evolution clinique des rats LEC	page 19
Figure 4 : PCR	page 25
Figure 5 : Anatomie du foie chez le rat – lobe médian et lobe latéral gauche	page 31
Figure 6 : Anatomie du foie chez le rat – vue postérieure	page 32
Figure 7 : Courbes de poids	page 42
Figure 8 : Courbes de l'AST	page 43
Figure 9 : Courbes de l'ALT	page 44
Figure 10 : Courbes de la bilirubine	page 44
Figure 11 : Courbes de survie	page 48
Figure 12 : Rat transplanté (groupe 1)	page 50
Figure 13 : Rat contrôle	page 51
Figure 14 : Immunohistochimie	page 54

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AEC	activité enzymatique de la céruloplasmine
AOC	activité oxydase de la céruloplasmine
ARN	acide ribonucléique
ATP7B	gène humain de la maladie de Wilson codant pour la protéine ATP7B servant au transport du cuivre
atp7b	équivalent du gène ATP7B chez le rat LEC qui est le modèle animal de la maladie de Wilson
Cu ⁺⁺	cuivre
LE	Long Evans
LEA	Long Evans Agouti
LEC	Long Evans Cinnamon
PCR	polymerase chain reaction
RE	réticulum endoplasmique
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La maladie de Wilson

1.1.1 Historique

Décrite en 1912 par le neurologue américain S. Wilson ¹, la maladie de Wilson se caractérise par diverses atteintes hépatiques, neuro-psychiatriques, oculaires et autres. Celui-ci avait observé 4 jeunes patients qui souffraient de symptômes neurologiques (mouvements involontaires, spasticité, dysphagie, dysarthrie) et psychiatriques, dont l'état s'était progressivement détérioré jusqu'au décès. C'est à ce moment qu'il fut noté que ces patients avaient une dégénérescence de leurs noyaux lenticulaires ainsi qu'une cirrhose hépatique. Initialement désignée sous le nom de dégénérescence lenticulaire progressive, l'incidence familiale était attribuée à des facteurs environnementaux (toxines) plutôt que génétiques. Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard qu'il a été noté que cette maladie semblait plus fréquente dans la fratrie des patients atteints. La présence d'excédent de cuivre dans le foie et la cornée a ensuite été remarquée et sa relation avec un trouble du métabolisme du cuivre fut démontrée en 1952 ²⁻³. Son mode de transmission autosomal récessif a été mis en évidence suite à des études généalogiques de 30 familles affectées ⁴. L'anomalie génétique a été localisée au bras long du chromosome 13 grâce à des études de linkage réalisées chez une famille arabe consanguine et montrant la ségrégation de son locus avec celui de l'estérase D ⁵. Enfin, l'identification et le clonage du gène de la maladie de Wilson (ATP7B), accomplie presque simultanément par 3 groupes en 1993 (New York, Toronto, St-Louis) a permis de le localiser plus précisément au site 13q14-q21 ⁶⁻⁹.

1.1.2 Epidémiologie

La maladie de Wilson demeure une pathologie rare. Sa prévalence est estimée à 1 : 30 000 personnes ¹⁰. Cependant, la prévalence d'individus porteurs d'une mutation est d'environ 1 : 90. Il existe actuellement plus de 200 mutations différentes connues pour cette maladie et il a été remarqué que la plupart des patients atteints sont porteurs de deux mutations différentes. La majorité des mutations sont de type non-sens et la plus commune (40%) concerne une substitution histidine → glutamine en position 1069. Cette mutation résulte en la synthèse d'une protéine ayant un repliement anormal et qui est dirigée vers le réticulum endoplasmique où elle y est dégradée ¹⁰. Il semble également qu'il y ait une corrélation entre le phénotype de la maladie et le type de mutations retrouvées chez chaque patient. Cependant, comme il existe également une variabilité dans le phénotype des patients d'une même famille, d'autres facteurs seraient en cause dans les manifestations de cette maladie.

1.1.3 Manifestations cliniques

La maladie de Wilson est une maladie retrouvée surtout chez les patients jeunes (adolescent et jeune adulte) et dont l'atteinte peut être multisystémique, les deux organes les plus atteints étant le foie et le système nerveux central. La présentation clinique est très variée, allant de manifestations vagues et peu spécifiques à une maladie fulminante provoquant le décès. De façon générale, les patients jeunes (4-18 ans) se présenteront avec des signes et symptômes d'atteinte hépatique, alors que les adultes auront plutôt des symptômes neurologiques.

Comme manifestations hépatiques, toutes les présentations sont possibles : élévation asymptomatique des enzymes hépatiques découverte lors d'un examen sanguin de routine, diathèse hémorragique menant à la découverte d'une cirrhose, hypersplénisme secondaire à une hypertension portale, hépatite aiguë ou chronique, et même insuffisance hépatique fulminante avec coagulopathie sévère et encéphalopathie.

Au niveau neurologique, on retrouve des symptômes tels la dysarthrie, tremblements, dysphagie, mouvements choréiques et dystonie. Chez la population pédiatrique, on notera un trouble du langage avec parfois hypersalivation, ainsi qu'une détérioration des performances scolaires ou de l'écriture. Certains patients, peu importe leur âge, seront même référés à des psychiatres pour dépression, trouble phobique, comportement anti-social ou maladie schizophrénique.

Le signe classique de cette maladie est l'anneau de Kayser-Fleischer, retrouvé chez 80% des patients en général et chez presque tous les patients avec des symptômes neurologiques. Il s'agit d'un anneau brunâtre correspondant à un dépôt de cuivre sur la membrane de Descemet, située au niveau de la cornée. Sa présentation initiale est sous forme d'un demi-cercle entre 11:00 et 1:00, suivie par l'apparition d'un autre demi-cercle se développant au niveau du pôle inférieur entre 5:00 et 7:00. Les demi-cercles s'allongent par la suite jusqu'à se rejoindre et former un anneau complet, pouvant être visible à l'œil nu à travers un iris de couleur claire.

Au niveau hématologique, l'anémie hémolytique est une manifestation rare mais reconnue de cette maladie et est à l'origine des calculs pigmentés retrouvés dans la vésicule biliaire de ces patients.

Les complications rénales de cette maladie impliquent à la fois les glomérules et les tubules. On note une certaine réduction du taux de filtration glomérulaire dont la cause exacte n'est pour l'instant pas éclaircie (toxicité du cuivre au niveau des glomérules ou maladie rénale associée à la cirrhose de type syndrome hépato-rénal). La dysfonction tubulaire est variable et on peut retrouver parfois le syndrome de Fanconi (aminoacidurie, acidose tubulaire, anomalies électrolytiques résultant en calculs urinaires).

Finalement, des manifestations sur le plan cardiaque (cardiomyopathie, insuffisance cardiaque congestive, arythmies), endocrinien (hypoparathyroïdie, aménorrhée, atrophie testiculaire) et musculo-squelettique (arthralgies, ostéopénie, ostéochondrite disséquante) sont également décrites.

1.1.4. Diagnostic

Parmi tous les tests utilisés pour diagnostiquer la maladie de Wilson, la biopsie hépatique demeure l'examen standard. Cependant, d'autres investigations doivent être entreprises pour mieux renforcer le diagnostic (cf tableau I).

TABLEAU I: Tests diagnostiques

	Normal	Maladie de Wilson
Cuivre hépatique	15-55 µg/g	> 250 µg/g
Céruoplasmine	20-40 mg/dL	< 20 mg/dL
Cuivre urinaire	< 40 µg/dL	> 100 µg/dL

1.1.4.1 Biopsie hépatique

La biopsie hépatique permet un dosage du cuivre hépatique. Une valeur de cuivre hépatique > 250 µg/g est fortement en faveur de ce diagnostic. Ce taux peut aussi être élevé dans d'autres maladies cholestatiques (cirrhose biliaire primaire, cholangite sclérosante, hépatite auto-immune) mais à un moindre degré. La biopsie hépatique permet aussi d'observer des anomalies au niveau histologique. L'infiltration graisseuse et la déposition de glycogène, surtout dans les noyaux, sont notées précocément. Eventuellement, une cirrhose micronodulaire sera détectée avec, dans certains cas, de la fibrose et des nodules de régénération. En phase d'hépatite chronique active, on notera de la nécrose et fibrose avec une infiltration cellulaire inflammatoire³⁶.

1.1.4.2 Dosage sanguin de la céruloplasmine

Le taux de céruloplasmine dans la maladie de Wilson est caractéristiquement bas, à cause de sa dégradation due à son absence d'incorporation au cuivre. Un taux < 20 mg/dL est considéré positif. Cependant, ce test n'est pas toujours fiable, ayant jusqu'à 20% de faux négatifs et 10-20% de faux positifs. Il peut être faussement augmenté jusqu'à une valeur normale chez des patients ayant réellement la maladie de Wilson (20% des patients) parce qu'il augmente dans les périodes inflammatoires aiguës (infections), durant la grossesse et chez les personnes utilisant des suppléments d'oestrogènes. Il peut aussi être faussement diminué dans les déficiences protéiniques (malabsorption, malnutrition), chez les nouveaux-nés et chez les patients avec maladie hépatique chronique, de même que dans les insuffisances hépatiques aiguës ou fulminantes.

1.1.4.3 Cuivre urinaire

Une collecte urinaire de 24h en vue de déterminer la concentration du cuivre urinaire est en faveur du diagnostic si elle est > 100 µg/dL. Par contre, cette valeur n'est pas toujours fiable puisqu'elle peut être faussement élevée dans les maladies cholestatiques. Le dosage du cuivre urinaire après la prise orale de pénicillamine est probablement l'épreuve diagnostique qui permet la meilleure orientation étiologique, avant de réaliser une biopsie hépatique.

1.1.4.4 Cuivre sérique

Cette valeur dépend de la présentation clinique du patient. Elle sera élevée dans le cas d'un patient avec la maladie de Wilson qui se présente sous forme d'hépatite fulminante. Elle sera normale ou peu élevée chez un patient asymptomatique ou cirrhotique. Là-aussi, la valeur du cuivre sérique n'est pas une mesure complètement fiable, puisqu'elle peut donner des faux négatifs chez les patients avec une atteinte hépatique chronique ou chez les patients qui ont une maladie encore asymptomatique.

1.1.4.5 Examens radiologiques

Des anomalies sont souvent décrites dans divers examens d'imagerie cérébrale (CT-scan, RMN, PET-scan), reflétant sans doute les lésions tissulaires causées par l'accumulation de cuivre, mais ces trouvailles ne sont pas pathognomoniques de la maladie de Wilson.

Par exemple, on peut retrouver au CT-scan une dilatation des ventricules latéraux, plus particulièrement au niveau des cornes frontales, ainsi qu'une atrophie cérébrale et cérébelleuse diffuse. La RMN est un examen qui semble plus sensible que le CT-scan en ce qui concerne la détection précoce des lésions cérébrales. Un signe caractéristique appelé « face of the giant panda » a été décrit à la RMN, et est formé par la variabilité dans l'intensité des signaux (hyper-intensité du tegmentum, iso-intensité de la pars reticulata de la substance grise, hypo-intensité du collicule supérieur). Enfin, on observe au PET-scan une réduction significative du métabolisme du glucose dans le cervelet, striatum, cortex et thalamus¹⁰.

1.1.5 Traitement

1.1.5.1 Traitement médical

La base du traitement médical est composée d'agents chélateurs qui se lient au cuivre en excès. Le principal agent est la pénicillamine, qui a été historiquement l'agent de choix durant plusieurs décennies et reconnu comme pouvant renverser les symptômes hépatiques, neurologiques et psychiatriques, de même que diminuer les atteintes visualisées sur les biopsies hépatiques. Malgré le potentiel de ce médicament, il est associé à plusieurs effets secondaires, qui nécessitent parfois un arrêt de traitement et la prise d'un traitement médical alternatif, en l'occurrence la trientine. La trientine est associée à moins d'effets secondaires majeurs mais l'expérience clinique avec ce médicament n'est pas aussi grande qu'avec la pénicillamine. Certains experts le considèrent en première ligne à cause de l'incidence moins élevée d'effets secondaires. Dans les deux cas, la réponse clinique n'est pas immédiate et une bonne compliance au traitement est requise. Deux autres agents méritent mention, le zinc et les thiomolybdates, qui interfèrent avec l'absorption du cuivre. L'efficacité du traitement au zinc n'est pas établie de façon certaine et cet agent est aussi associé à des effets secondaires. Quant aux thiomolybdates, ils sont associés à une suppression médullaire de même que des malformations squelettiques chez les animaux si donnés avant la fusion des épiphyses. Son utilisation chez les enfants et adolescents doit donc être faite avec beaucoup de précaution.

1.1.5.2 Transplantation hépatique

La transplantation orthotopique du foie est réservée aux patients avec insuffisance hépatique fulminante ou cirrhose qui progresse malgré le traitement médical. Il est le seul traitement qui apporte une guérison aux patients, au prix d'une intervention invasive et d'un besoin d'immunosuppression à vie. Sans recours à la transplantation, le décès est presque assuré chez ces patients. Après la transplantation, l'homéostasie du cuivre est restaurée en-dedans de 6 mois et la plupart des signes et symptômes sont améliorés. Selon les données actuelles, la survie à 1 an post-transplantation est de 85% avec un excellent pronostic à long terme. Certains centres ont même pratiqué des transplantations de donneurs vivants, incluant des donneurs hétérozygotes³⁷⁻³⁸. Cette procédure n'est cependant pas indiquée chez les patients avec une maladie neuropsychiatrique avancée qui n'a pas répondu au traitement médical, puisque les dommages cérébraux déjà existants ne seront pas renversés par une restauration de l'homéostasie du cuivre. Il semblerait, du moins à court terme, que les paramètres biochimiques se normalisent, même après la transplantation d'un foie provenant de donneurs hétérozygotes, avec une amélioration partielle (et parfois même complète) des anneaux de Kayser-Fleischer.

1.2 Pathophysiologie de la maladie de Wilson

1.2.1 Métabolisme du cuivre

Le cuivre est un cofacteur de plusieurs enzymes (lysyl oxidase, cytochrome-c oxidase, superoxide dismutase, dopamine β -hydroxylase, tyrosinase, monoamine oxidase). La consommation quotidienne de cuivre (2-6 mg/d) excède les besoins et des mécanismes ont été développés pour mieux maintenir sa balance.

Après absorption intestinale au niveau du grêle (principalement le duodénum), le cuivre se lie à l'albumine pour être transporté au foie, reins ou autres tissus (cerveau, yeux).

A son arrivée à l'hépatocyte, le cuivre est transporté à travers la membrane basolatérale grâce à une protéine membranaire nommée Ctrl. Cette protéine ne semble pas jouer de rôle quant à l'homéostasie du cuivre cependant. Après son entrée dans l'hépatocyte, le cuivre est lié à des métallochaperones, dont Atox1, ou est complexé à des métallothionéines. La protéine chaperone Atox1 est essentielle au métabolisme du cuivre, puisqu'elle doit se lier à une région particulière de l'ATP7B pour lui permettre de jouer son rôle normal dans la sécrétion du cuivre. Quant aux métallothionéines, bien qu'elles n'ont aucun rôle direct dans la sécrétion du cuivre, elles fonctionnent probablement en protégeant la cellule contre la toxicité de ce métal lourd en cas d'accumulation.

Le cuivre est incorporé à l'apo-céruloplasmine au niveau du Golgi à l'aide de l'ATP7B, cette protéine étant elle-même située sur la membrane de l'appareil de Golgi (plus précisément le trans-Golgi).

L'apo-céruleplasme est synthétisée par le foie et lie 6 atomes de cuivre avant d'être excrétée dans la circulation sanguine sous forme d'holo-céruleplasme. Environ 90% du cuivre sérique circule lié à l'holo-céruleplasme, le reste étant lié à l'albumine, des acides aminés ou demeurant sous forme libre.

L'holo-céruleplasme sera ensuite transporté vers des enzymes ou sécrété dans la circulation sanguine. Au fur et à mesure que la concentration cellulaire de cuivre augmente, l'excès de cuivre est accumulé dans des vésicules et est excrété dans la bile par la membrane apicale canaliculaire, grâce encore à l'ATP7B qui a été redirigé vers cet endroit. Le mécanisme exact du mouvement des vésicules vers la membrane canaliculaire reste obscur pour l'instant. Cependant, on a identifié une protéine cytosolique, nommée Murr1, chez le terrier Bedlington ainsi que son équivalent dans le foie humain, qui pourrait participer à ce processus. La liaison du cuivre à l'apo-céruleplasme et son excrétion biliaire sont deux étapes qui requièrent donc l'action de la protéine transmembranaire ATPase de type P nommée ATP7B, tirant son nom du fait que durant la réaction, un résidu d'acide aspartique est phosphorylé.

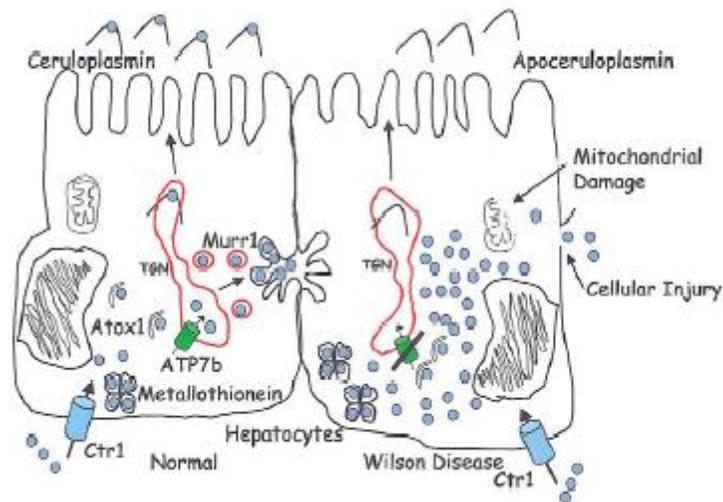


FIGURE 1 : Métabolisme du cuivre

Figure tirée de Gitlin J. Wilson Disease. *Gastroenterology* 2003; 125 :1866-77

En l'absence d'ATP7B, le cuivre n'est pas incorporé à l'apoceruloplasmine et celle-ci est alors dégradée, donnant lieu à des taux sériques bas de céruloplasmine. Comme l'excrétion biliaire du cuivre n'est pas faite adéquatement, le cuivre s'accumule dans le foie jusqu'à des niveaux toxiques et joue un rôle dans la formation des radicaux libres et l'oxydation des lipides et protéines membranaires. De plus, plusieurs systèmes intracellulaires (organelles, ADN, microtubules, enzymes) sont perturbés suite à la toxicité du cuivre. Initialement, l'excédent de cuivre s'accumule dans le cytosol des hépatocytes. Les niveaux de cuivre augmentant sans cesse, le cuivre est transféré dans les lysosomes, probablement lié à des métallothionéines. Des dommages sont faits graduellement aux hépatocytes qui se nécroseront et relâcheront le cuivre dans la circulation sanguine. Le cuivre sécrété

dans la circulation est déposé dans des organes tels le cerveau, les reins et la cornée. Au niveau des hépatocytes, des anomalies structurales se produisent et impliquent initialement le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les peroxisomes et les noyaux. Normalement, l'excrétion urinaire du cuivre est négligeable comparée à l'excrétion biliaire du cuivre qui est sa voie principale d'élimination. Cependant, elle est augmentée dans la maladie de Wilson.

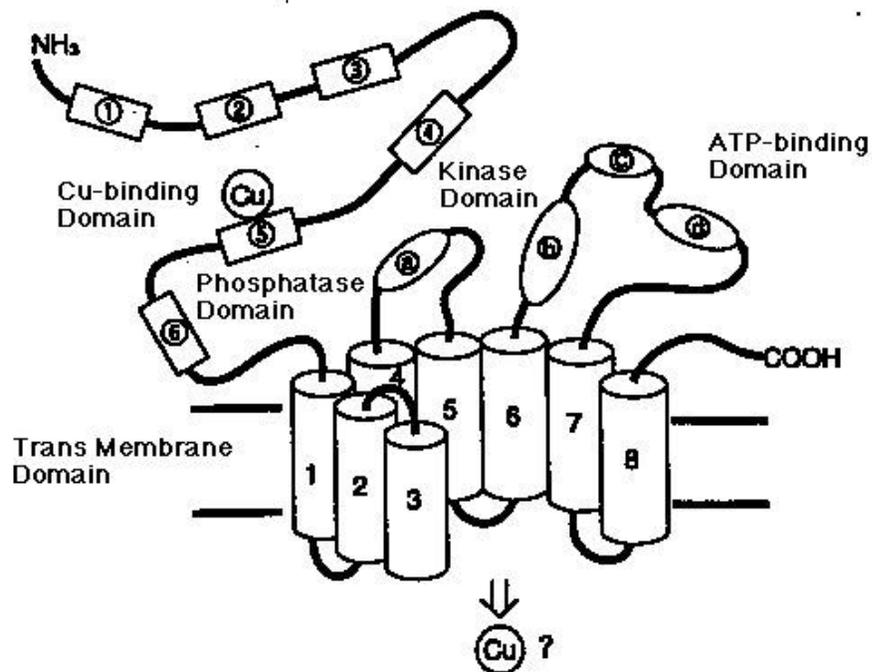


FIGURE 2: ATP7B

Figure tirée de socyo.high.hokudai.ac.jp
Center for Research and Development in Higher Education,
Hokkaido University

1.2.2 Gène ATP7B

Ce gène contient 21 exons¹⁵ et code pour une protéine transmembranaire ATPase de type P formée de 1411 acides aminés⁶, dont l'expression se fait majoritairement au niveau du foie et des reins. La protéine ATP7B est composée de 8 boucles transmembranaires formant un canal à travers lequel le cuivre est transporté après l'hydrolyse de l'ATP. Elle comporte un domaine comprenant 6 motifs pouvant lier le cuivre dans sa portion N-terminale, un domaine liant l'ATP, un domaine de phosphorylation et un domaine de transduction (responsable de la conversion de l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport du cuivre) ainsi qu'un canal transmembranaire (FIGURE 2).

Un fait surprenant est que cette protéine est homologue à 56% à celle du gène impliqué dans la maladie de Menkes (ATP7A), où une déficience en cuivre, plutôt qu'un excédent, est observée⁶. Plus de 200 mutations du gène ATP7B ont été identifiées jusqu'à maintenant¹⁶, ce qui a permis d'établir une corrélation entre différentes mutations et leur phénotype, ainsi que d'offrir du dépistage génétique aux familles où une mutation a été préalablement démontrée¹⁰⁻¹¹.

De façon très intéressante, les différentes séquences des gènes des maladies de Wilson et Menkes partagent de grandes similarités avec celles de gènes retrouvés chez des bactéries et levures résistantes aux métaux lourds (mercure, cadmium, cuivre). Dans la plupart des cas, ces gènes sont situés dans les plasmides, qui peuvent se répliquer dans la bactérie pour lui conférer sa résistance au métal. Ces gènes comportent également une région N-terminale servant à lier les métaux, comme les gènes des maladies de Wilson et Menkes. Ces organismes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*,

Saccharomyces cerevisiae, possèdent tous des ATPases de type P similaires à celles retrouvées chez les humains. La conservation des ces régions dans ces organismes d'un stade évolutif si différent a permis de donner une base aux recherches sur les maladies de Wilson et Menkes. C'est d'ailleurs grâce à des études menées sur *Enterococcus hirae* que des chercheurs ont pu déterminer que le gène de la maladie de Menkes code pour un transporteur du cuivre^{15,28}.

La localisation intracellulaire de la protéine ATP7B a été l'objet de controverses. Des questions se sont posées (et continuent à se poser) sur sa localisation ainsi que sur le rôle de la concentration environnante de cuivre ou de la polarité des cellules. De nombreuses études ont rapporté des localisations différentes de l'ATP7B : appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, compartiments vésiculaires, endosomes, mitochondries, membrane cytoplasmique ou membrane apicale canaliculaire¹⁷⁻²⁷.

1.3 Modèle animal de la maladie de Wilson

1.3.1 Le rat LEC

L'établissement d'une colonie de rats LEC date de 1975 à l'Université Hokkaido au Japon. A l'époque, des rats LE non consanguins ont été obtenus d'une colonie de rats maintenue par un autre laboratoire. Chaque rat avait une couleur différente de fourrure (cannelle, brune-noire, agouti). Pour obtenir une ségrégation des couleurs, les rats de même couleur ont été croisés ensemble. Seulement les rats de couleur canelle et agouti ont été gardés au centre de l'université, appelé Center for Experimental Plants and Animals, et les noms de rats LEC et rats LEA leur ont été donnés²⁹.

Lors des croisements faits de façon routinière au centre, il fut noté en 1984 qu'un rat provenant de la 24^e génération manifestait des signes d'hépatite. Comme ce rat avait déjà été croisé avant de tomber malade, sa progéniture a été soigneusement observée pour l'émergence d'hépatite qui s'est avérée présente dans chaque génération successive.

Puisque les rats étaient croisés avant l'apparition de leur hépatite, il a été facile de maintenir la progéniture avec cette caractéristique. Des études ont alors été réalisées sur le mode de transmission et ont établi qu'il s'agissait d'une transmission autosomale récessive. Ce gène a d'abord été nommé hts (pour hépatite) puis finalement atp7b, lorsque son équivalence avec le gène humain ATP7B a été mise en évidence. Les rats LEC ont donc été initialement utilisés pour des études sur l'hépatite, de même que le cancer hépatique, parce

qu'on s'est par la suite rendu compte que les rats survivant à l'hépatite développaient en grande majorité un hépatome vers l'âge d'un an³⁰.

L'association des rats LEC avec la maladie de Wilson s'est faite plus tard, après que des chercheurs ont réalisé que les caractéristiques histologiques retrouvées dans les foies de ces rats comportaient des similitudes avec celles des patients atteints de cette maladie³⁵. Le métabolisme du cuivre a donc été étudié chez les rats LEC. Des taux diminués de céruloplasmine ont été trouvés (1991), de même qu'une absence d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine (1993), une excrétion réduite du cuivre biliaire (1994) et des concentrations en cuivre hépatique très élevées (1991). Après l'identification du gène ATP7B chez l'humain, on s'est servi de sa séquence pour identifier son équivalent chez le rat LEC, et cet équivalent a été démontré homologue à 82% au gène humain. Enfin, on a noté que les rats LEC répondaient aussi au traitement de pénicillamine utilisé chez les patients souffrant de la maladie de Wilson. Pour toutes ces raisons, le rat LEC est considéré comme le modèle animal de cette maladie.

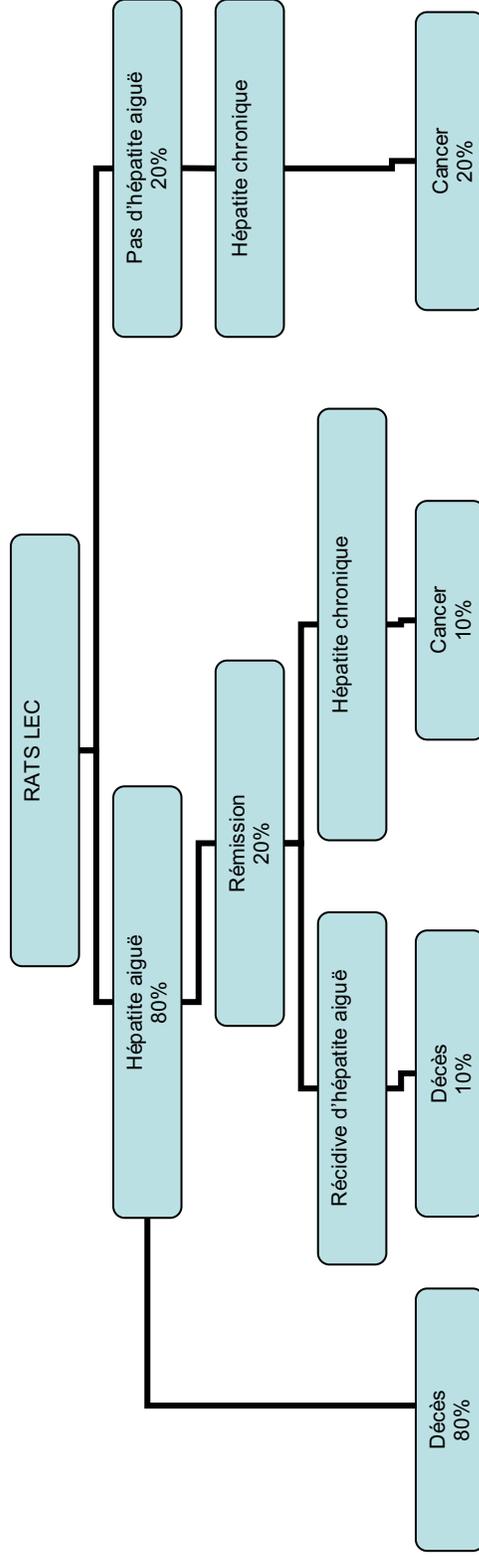
1.3.2. Données sur le rat LEC et similarités avec la maladie de Wilson

80% des rats LEC développent des signes d'hépatite (ictère, perte de poids, oligurie, hémorragies sous-cutanées, mouvements ralentis) vers l'âge de 4 mois en moyenne. On observe l'ictère au niveau des oreilles, queue, partie distale des extrémités et dans les sécrétions.

De ces rats, 80% vont décéder dans un délai d'une à deux semaines et 20% survivront à leur hépatite. Parmi les rats survivants, la moitié aura une récurrence d'hépatite et en mourra tandis que l'autre moitié souffrira d'hépatite chronique et développera une néoplasie hépatique après 1 an.

Les 20% des rats LEC n'ayant pas développé d'hépatite aiguë vers l'âge de 4 mois vont par contre évoluer vers une hépatite chronique puis un cancer après 1 an (FIGURE 3).

FIGURE 3 : Évolution clinique des rats LEC



Les rats LEC démontrent une accumulation excessive de cuivre dans divers tissus lorsqu'on les compare à des rats normaux. En effet, la concentration de cuivre hépatique atteint un niveau toxique dès l'âge de 3 mois (ce qui suggère un lien entre la concentration de cuivre et le développement ultérieur de l'hépatite). La concentration de cuivre au niveau du cerveau et des reins est également supérieure à la normale (1,8 fois la normale chez les rats de 8 mois pour ce qui est de la concentration de cuivre dans les reins).

Du point de vue biochimique, les taux de céruloplasmine sérique sont très diminués par rapport à ceux de rats normaux. Les trouvailles histologiques révèlent de la stéatose, des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme et un pléiomorphisme des mitochondries, tout comme dans la maladie de Wilson. De plus, l'excrétion biliaire du cuivre est aussi réduite.

En traitant les rats LEC âgés de 3 mois avec de la pénicillamine, on prévient l'apparition d'hépatite. Les tests de fonction hépatique demeurent peu perturbés et les examens histologiques sur les coupes de foie ne montrent pas d'anomalies. Les rats ont un cuivre urinaire augmenté et une concentration de cuivre hépatique diminuée par rapport à des rats non traités de façon prophylactique. Toutes ces données sont similaires à celles retrouvées chez des patients humains traités avec un agent chélateur. De la même façon, l'administration de trientine à des rats LEC inhibe l'apparition d'hépatite et le développement d'hépatome³³.

1.3.3 Particularités du rat LEC non retrouvées dans la maladie de Wilson

Il y a cependant quelques différences entre la maladie manifestée par le rat LEC et la maladie de Wilson. En premier lieu, notons les rares symptômes neurologiques chez le rat et l'absence d'anneau de Kayser-Fleischer dans la cornée³¹. Le rat LEC qui survit à l'hépatite finira presque inmanquablement par développer une néoplasie du foie (>90%)³², ce qui est extrêmement rare chez l'humain.

En effet, seulement 12 cas de carcinome hépatocellulaire ont été rapportés chez des patients ayant été traités pour la maladie de Wilson³³.

1.3.4. Gène *atp7b*

Le gène *atp7b*, homologue au gène *ATP7B* de la maladie de Wilson chez l'humain, a été localisé au chromosome 16, plus précisément à la position 16q12.23-12.3¹⁴. C'est en se servant de la séquence du gène *ATP7B* que les chercheurs ont pu localiser et cloner son gène équivalent chez le rat LEC. L'ADNc chez le rat a une séquence d'acides aminés identique à 82% à celle du gène humain³⁵. Une délétion d'au moins 1300 paires de bases a pu être démontrée³¹ et elle comprend environ 900 pb dans la région terminale 3', enlevant ainsi le domaine liant l'ATP.

1.4 Buts de l'étude

Le but de cette étude est d'établir le rôle de la transplantation d'hépatocytes chez le rat LEC, modèle animal de la maladie de Wilson .

1.5 Méthodologie

1.5.1 Maintien d'une cohorte de rats LEC au laboratoire animal de l'Hôpital Sainte-Justine

Le protocole de recherche a été approuvé par le Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine.

Les rats LEC ont bénéficié d'une diète normale (Telad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan) contenant du cuivre, avec eau ad libitum. Ils étaient soumis à un cycle de 12 heures d'éclairage suivis de 12 heures de noirceur.

Quelques rats LEC (Charles River, Yokohama, Kanagawa, Japon) ont été utilisés pour monter une colonie en 1996, afin de poursuivre des études sur la maladie de Wilson. Pour arriver à maintenir la colonie et garder un nombre suffisant de rats, il a fallu les croiser avec des rats normaux LE (Charles River, St-Constant, Canada) et génotyper ensuite les rats pour déterminer lesquels étaient hétérozygotes ou homozygotes pour la mutation (LEC x LE). Nous appelons homozygotes les rats qui ont la mutation *atp7b*, c'est-à-dire

les véritables rats LEC. Les croisements avec des rats normaux étaient rendus nécessaires puisque les femelles LEC (dites homozygotes) devenaient infertiles après un certain temps, surtout après avoir elles-mêmes souffert d'hépatite. Les portées des femelles LEC étaient aussi plus petites avec un taux de mortalité de la progéniture qui était très élevé.

1.5.2 Groupes de rats

Trois groupes de rats ont été utilisés dans cette étude. Le groupe 1 comportait 12 rats LEC qui ont subi une hépatectomie partielle et une transplantation d'hépatocytes. Les groupes 2 et 3 étaient les groupes contrôles : le groupe 2 comportait 6 rats LEC n'ayant subi qu'une hépatectomie partielle et le groupe 3 comportait 6 rats LEC n'ayant subi aucune manipulation. Le groupe 2 a été créé dans le but de démontrer l'absence d'effet néfaste de l'hépatectomie partielle sur la survie et était donc un contrôle interne.

1.5.3 Génotypage des rats LEC

La détermination du génotype (homozygote vs hétérozygote) se faisait en 2 étapes : extraction d'ADN et PCR. Encore une fois, l'étape de génotypage devait se faire parce que nous avons dû croiser les rats LEC avec des rats normaux LE afin de maintenir la colonie de rats LEC et garder un nombre suffisant de rats LEC pour nos expériences.

1.5.3.1 Extraction d'ADN

Vers l'âge de 4 semaines, les rats étaient sevrés et génotypés. L'ADN était extrait à partir de quelques millimètres de queue auxquels étaient rajoutés 480 µL de tampon de lyse (urée 4M, Tris 1M pH 8,8 , 0,5% Na-lauroylsacrosine, EDTA 10 mM, pH=7) et 20 µL de protéinase K (Qiagen, Mississauga, Canada). Le tout était ensuite incubé avec légère agitation pendant une nuit à 55°C. Le lendemain, une centrifugation à 13.000 rpm était faite durant 10-15 minutes. Au surnageant qui était récupéré, on ajoutait 450 µL d'isopropanol et ceci était mélangé délicatement par inversion pour faire apparaître la méduse d'ADN. Une centrifugation à 13.000 rpm est ensuite répétée pour 10-15 minutes et le culot d'ADN est récupéré. Ce culot est suspendu avec 450 µL d'éthanol à 95% et re-centrifugé à 13.000 rpm pour 10-15 minutes. Ces gestes sont ensuite répétés après l'avoir resuspendu avec 450 µL d'éthanol à 70% puis 100 µL de tampon d'extraction (Tris 1M pH 8, EDTA 25mM, NaCl 5M, 0,5% Triton X-100). La suspension est ensuite incubée à 55°C pendant une heure.

1.5.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Le matériel utilisé pour procéder au PCR a été le suivant : 10X PCR buffer (GibcoBRL), MgCl₂ 50 mM (GibcoBRL), dNTP Mix 100 mM (GibcoBRL), Taq DNA polymerase (5 U/µL)(GibcoBRL) ainsi que les amorces pour les exons 2 et 18.

Pour l'exon 2 (présent dans les rats normaux), l'amorce sens était 5'-GGCATGACTTGTCATTCTTG-3' et l'amorce anti-sens était 5'-GATCTTGCCTTCGATGGAG-3'.

Pour l'exon 18 (absent dans les rats LEC), l'amorce sens était 5'-GGCATCAACAAAGTCTTTGC-3' et l'amorce anti-sens était 5'-CTTATAAGGACCACGTCGG-3'.

Les amorces choisies encadrent une séquence spécifique d'ADN à amplifier, plus particulièrement les exons 2 et 18. L'exon 2 servira de contrôle interne à la technique et c'est la présence ou l'absence de l'exon 18 qui déterminera le génotype du rat. Le rat LEC (homozygote) n'aura pas de bande pour l'exon 18 alors que le rat normal (hétérozygote) en aura une (FIGURE 4).

L'ADN extrait sera ajouté au mélange qui est ensuite soumis à 35 cycles dans un thermocycleur dont chaque cycle se définit ainsi : dénaturation initiale 94°C pour 5 min, dénaturation 94°C pour 30 sec, hybridation 58°C pour 45 sec, élongation 72°C pour 45 sec, élongation finale 72°C pour 7 min, refroidissement 4°C.

Les produits de PCR sont enfin coulés dans un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et vont migrer à 80 V pendant 1 heure. Après l'électrophorèse, le gel est exposé aux rayons UV.

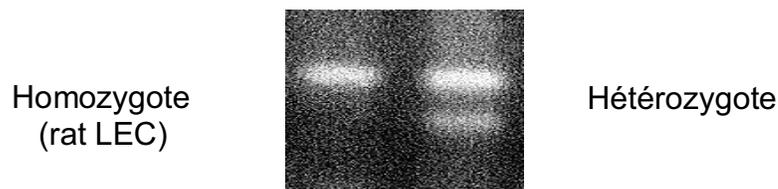


Figure 4 : PCR

1.5.4 Tests de fonction hépatique

Des prélèvements sanguins étaient effectués aux deux semaines pour suivre l'évolution des rats sur le plan biochimique. Pour cette procédure, les rats étaient anesthésiés à l'isoflurane et le sang était prélevé à partir des veines saphène ou dorsale de la queue. Les spécimens étaient ensuite centrifugés afin de précipiter les globules et ne recueillir que le sérum. Les tests de fonction hépatique (dosages des enzymes AST, ALT et bilirubine) étaient effectués au laboratoire du département de biochimie de l'Hôpital Sainte-Justine. Ils permettaient d'identifier les rats qui ont souffert d'hépatite mais qui n'en présentaient pas les signes cliniques, i.e. ceux qui ont souffert d'une hépatite biochimique seulement (élévation des transaminases/bilirubine sans signes cliniques tels ictère, perte de poids, oligurie, hémorragies sous-cutanées, mouvements ralentis).

1.5.5 Mesure de l'activité oxydase de la céruloplasmine

Il s'agit de la méthode développée par Schosinsky, Lehmann et Beeler en 1974 ⁴⁰. Cette méthode utilise l'activité enzymatique de la céruloplasmine pour déterminer de façon indirecte le dosage de la céruloplasmine. Le substrat utilisé est la o-dianisidine dihydrochlorure. Ce réactif forme un composé stable de couleur jaune-brune, en présence de céruloplasmine et d'oxygène, à un pH de 5,0.

Les trois réactifs nécessaires sont les suivants : solution tampon acétate (pH 5,0; 0,1 N), acide sulfurique 9 M, o-dianisidine dihydrochlorure 7,88 mM de même que le sérum du rat.

Pour doser la céruloplasmine d'un rat, deux tubes sont nécessaires. Tout d'abord, 0,05 mL de sérum et 0,75 mL de tampon acétate sont placés dans chaque tube et ceux-ci sont incubés à 30°C pendant 5 minutes. La réaction est débutée en ajoutant 0,2 mL d' o-dianisidine dihydrochloride dans chaque tube. Après 5 min, la réaction est arrêtée en ajoutant 2 mL d'acide sulfurique dans le premier tube. Après 15 min, elle est arrêtée dans le deuxième tube en lui ajoutant aussi 2 mL d'acide sulfurique. L'absorbance des solutions de chaque tube est ensuite mesurée à 540 nm.

L'activité enzymatique (oxydase) de la céruloplasmine est exprimée en unités internationales et se mesure de la façon suivante :

$$\text{AOC} = (A_{15} - A_5) \times 6,25 \times 10^{-1} \text{ U/mL},$$

A_{15} étant la mesure de l'absorbance à 15 minutes et A_5 étant la mesure de l'absorbance à 5 minutes. Une valeur normale est entre 62-140 U/L.

1.5.6 Prélèvement des hépatocytes sur le rat donneur

Cette procédure a été basée sur la technique de perfusion en deux étapes décrite par Berry et Friend⁴². Des rats femelles (200-300 g) de type LE ont été utilisés comme donneurs. Le rat donneur est d'abord anesthésié à l'isoflurane. La région abdominale est rasée puis une incision médiane est faite au bistouri. La veine porte principale est identifiée et est canulée avec un angiocath Fr. 18 ou 20, choisi selon le calibre de la veine. Une première perfusion du foie est faite avec 250 mL de solution de pré-perfusion (cf Annexes). La veine cave inférieure

est sectionnée dans sa portion infra-rénale. La cage thoracique est ouverte et la veine cave supérieure est également sectionnée. Ceci crée un circuit ouvert et une deuxième perfusion est maintenant effectuée avec 250-500 mL de solution de perfusion (cf Annexes) comprenant la collagénase. Au cours de cette perfusion, l'apparence du foie change graduellement à cause de sa digestion par la collagénase. En effet, sa couleur, originalement brune foncée, évolue vers le beige pâle et sa texture passe de ferme à molle. Les 2 perfusions s'effectuent à 999 mL/h, pour augmenter les chances que la solution se rende le plus distalement possible à travers le foie. La solution de perfusion contenant la collagénase est cessée selon le jugement de l'opérateur. En effet, le passage d'une trop grande quantité de collagénase digère trop le foie qui alors s'ouvre et s'affaisse complètement, rendant impossible la récupération des hépatocytes. De façon inverse, le passage d'une trop faible quantité de collagénase ne permet pas la récupération d'une quantité appropriée d'hépatocytes.

Une fois la deuxième perfusion terminée, le foie est délicatement libéré de ses attaches et placé dans une boîte de Petri où la capsule de Glisson est retirée. Le tissu non digéré est ensuite séparé du reste avec des instruments peu traumatiques (cotton-tige, spatule) afin de minimiser les dommages cellulaires.

La suspension d'hépatocytes est ensuite filtrée à travers une mèche de 250 μm et les hépatocytes sont incubés à 37°C dans une solution de suspension (cf Annexes) pendant 30 minutes.

1.5.7 Isolement des hépatocytes

La suspension de cellules est refroidie durant 5 min à 0°C. Une filtration de cette suspension cellulaire est faite à travers des mèches de 250 µm puis de 100 µm. La suspension filtrée est ensuite centrifugée (4°C, 50 g, 2 minutes) et le surnageant retiré. Le culot d'hépatocytes est resuspendu avec 10 mL de solution de suspension. Une centrifugation et resuspension sont répétées à 2-3 reprises. Enfin, la solution finale est filtrée dans une mèche de 100 µm et gardée à 0°C.

La solution finale contient les hépatocytes qui serviront à transplanter les rats LEC. Avant de procéder à la transplantation, elle est soumise au test d'exclusion au bleu de trypan pour évaluer la viabilité cellulaire et calculer le nombre approximatif de cellules.

1.5.8 Détermination de la viabilité cellulaire et du décompte cellulaire

Une dilution 1 : 5 est effectuée. Pour ce faire, 500 µL de la solution finale d'hépatocytes sont ajoutés à 2,0 mL de PBS (pH 7,4, Sigma) et 100 µL de bleu de trypan (0,4%, Sigma). 100 µL sont ensuite retirés du mélange final.

Les cellules ayant exclu le bleu de trypan (cellules viables) et les cellules teintées de bleu de trypan (cellules non viables) sont comptées au microscope.

$$\text{viabilité cellulaire} = \frac{\text{nombre de cellules viables}}{\text{nombre de cellules totales}} \times 100$$

1.5.9 Hépatectomie partielle

Le foie du rat a deux caractéristiques particulières : il est composé de 4 lobes et ne contient pas de vésicule biliaire. Lorsque la cavité abdominale est ouverte, les deux lobes les plus superficiels sont le lobe médian et le lobe latéral gauche. Ils recouvrent les deux lobes postérieurs, nommés lobe caudé et lobe latéral droit. Tous ces lobes sont joints par du tissu avasculaire entourant la veine cave inférieure. L'hépatectomie partielle est l'une des opérations les plus couramment utilisées chez le rat. La technique a été initialement décrite par Higgins et Anderson en 1931⁴¹ et est une résection de 60-65% du parenchyme hépatique.

Après un jeûne de quelques heures afin de diminuer le volume gastrique, on procède à l'anesthésie en faisant inhaler de l'isoflurane au rat. L'avantage de l'isoflurane, par rapport aux autres méthodes d'anesthésie, est qu'il est beaucoup plus facile de contrôler la profondeur de l'anesthésie chez ces rats qui sont particulièrement fragiles à toutes manipulations, incluant les prises de sang. Après avoir fait plusieurs tentatives infructueuses aux agents anesthésiques habituels (Xylazine, Ketamine), il est devenu évident que les rats y étaient beaucoup trop fragiles et ce, même après avoir réduit considérablement les doses. Chaque rat réagissait cependant différemment des autres, et quand l'un mourrait de son anesthésie, un autre pouvait y survivre après avoir reçu une dose équivalente. L'utilisation de l'isoflurane a permis d'ajuster la concentration simultanément selon la réaction du rat, ainsi que de l'ajuster individuellement à chaque animal.

Après anesthésie, une incision médiane épigastrique est pratiquée au bistouri et on procède à la division du ligament falciforme et de la pars flaccida. Les deux lobes superficiels (médian et latéral gauche) sont ensuite extériorisés en effectuant une légère pression sur le thorax. Une ligature de soie 3-0 est placée autour des lobes, le plus près possible de la veine cave inférieure, ce qui lie en bloc les pédicules portes et les veines sus-hépatiques de ces lobes. Le parenchyme hépatique de ces lobes est ensuite réséqué à 2-3 mm de la ligature pour garder un moignon suffisant et éviter l'hémorragie post-opératoire.

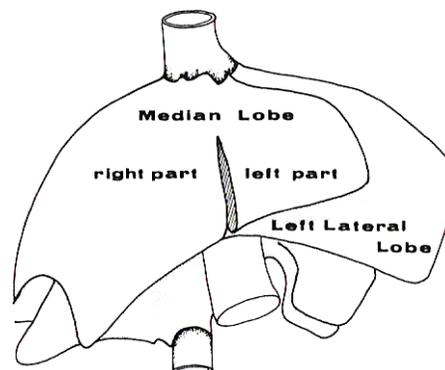


FIGURE 5 : Anatomie du foie chez le rat – lobe médian et lobe latéral gauche (tous deux sont réséqués lors de l'hépatectomie partielle)

Figure tirée de Castaing D. et al, Hepatic and portal surgery in the rat. Masson, Paris, 1980

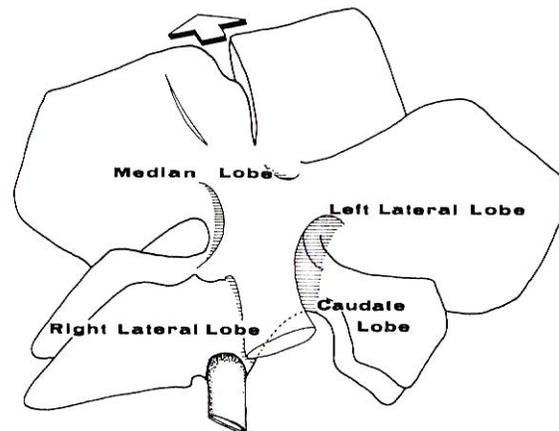


FIGURE 6 : Anatomie du foie chez le rat – vue postérieure des 4 lobes

Figure tirée de Castaing D. et al, Hepatic and portal surgery in the rat. Masson, Paris, 1980

C'est après la résection des deux lobes superficiels que l'injection intra-splénique d'hépatocytes est effectuée, s'il s'agit du groupe de rats à transplanter (groupe 1). Si la chirurgie n'est pas suivie de transplantation (6 rats contrôles – groupe 2), la fermeture de la cavité abdominale (péritoine et muscles) se fait avec un surjet au Vicryl 3-0 et la fermeture de la peau avec un sous-cuticulaire au Monocryl 4-0.

Les rats sont ensuite placés sous une lampe chauffante et surveillés étroitement durant les heures suivantes. Lorsque leur état est jugé satisfaisant, ils ont de nouveau accès à leur diète régulière.

1.5.10 Transplantation intra-splénique des hépatocytes

La solution obtenue après l'isolation des hépatocytes est gardée sur la glace en attendant le moment de la transplantation. Un mL de cette solution (contenant entre $2,6 \times 10^5$ – $3,6 \times 10^7$ hépatocytes) est utilisé pour la transplantation qui est faite par l'entremise d'une injection intra-splénique. Après l'hépatectomie partielle, l'extrémité distale de la rate est extériorisée et stabilisée, puis une injection de 1 mL est faite très lentement, en utilisant une seringue 28G. Ce type de seringue a été choisi à cause du plus petit calibre de l'aiguille, dans le but de minimiser le risque de saignement. Après l'injection et le retrait de l'aiguille, une pression digitale est faite pendant 30-60 secondes sur le point d'entrée de l'aiguille.

Post-transplantation, l'immunosuppression est maintenue grâce à des injections intra-péritonéales hebdomadaires de tacrolimus (Prograf, Fujisawa, Japon) à une dose de 0,02 mg/kg/jour⁸³.

1.5.11 Sacrifice des rats et canulation du cholédoque

Le rat est pesé la journée de son sacrifice (entre 21-27 semaines). Après induction de l'anesthésie à l'isoflurane, une incision médiane est faite au bistouri. Le cholédoque est identifié et canulé à l'aide d'une canule PE-10 (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). La canule est soigneusement fixée avec des sutures et la bile est récoltée dans un tube eppendorf placé dans la glace. La canulation est cessée lorsque la quantité de bile récoltée est de 1 mL. Le foie est ensuite détaché et sectionné en plusieurs morceaux qui seront placés dans des cryotubes et mis dans l'azote liquide. Ces morceaux de foie

serviront à doser le cuivre hépatique, rechercher la présence du gène *atp7b* et aux différentes études histologiques.

1.5.12 Mesure de la concentration du cuivre hépatique et biliaire

Les morceaux de foie sont digérés dans l'acide nitrique et perchlorique (2,5 :1, v/v). La mesure de la concentration de cuivre dans le foie et la bile se fait ensuite en spectrophotométrie d'absorption (Thermo Instruments, Mississauga) et est exprimée en $\mu\text{mol/g}$ (hépatique) et $\mu\text{mol/L}$ (biliaire).

1.5.13 Histologie

Une portion des spécimens a été fixée à la formaline 10% puis une inclusion à la paraffine a été faite. Des coupes de 5 μm ont ensuite été pratiquées, de même qu'une coloration à l'hématoxyline et éosine.

Les coupes ont été examinées par un pathologiste ayant de l'expérience sur l'examen histologique des maladies hépatiques et ne connaissant pas le groupe du rat. Les biopsies ont été gradées sur 6 points : degré de polyploidie, stéatose, apoptose, mitose, prolifération des cholangiocytes et fibrose.

La polyploidie a été gradée selon la proportion de cellules affectées : grade 1 (0-10% des cellules), grade 2 (11-25%), grade 3 (26-50%) et grade 4 (> 50%).

L'apoptose était soit gradée absente (0 corps apoptique/champ), légère (1-5) ou sévère (> 5).

La stéatose, mitose, prolifération des cholangiocytes et fibrose ont été gradées de la même façon : absente, légère, modérée ou sévère.

1.5.14 Détection de l'ARNm du gène atp7b

Après le sacrifice, certains morceaux de foie étaient conservés à -70°C. Pour vérifier la présence dans le foie transplanté du gène atp7b, une extraction de l'ARN suivie de RT-PCR ont été effectués.

1.5.14.1 Extraction de l'ARN

Homogénéisation

0,75 mL de TRIzol (Gibco BRL, Ontario, Canada) par 50-100 mg de tissu était ajouté.

Séparation des phases

Une incubation à température ambiante pour 5 minutes est effectuée pour permettre une dissociation des complexes nucléo-protéiques. 0,2 mL de chloroforme est ensuite ajouté et le tube est agité manuellement pendant 15 secondes puis incubé à 15-30°C pour 2-15 minutes. Une centrifugation à 12.000 g est faite par la suite à 4°C pour 15 minutes et sépare la solution en trois phases : phase supérieure incolore et aqueuse, interphase et phase inférieure rougeâtre.

Précipitation de l'ARN

La phase aqueuse incolore (contenant l'ARN) est transférée à un nouveau tube. 0,5 mL d'isopropanol sont ajoutés et le tout est incubé à 15-30°C pendant 10 minutes. Une centrifugation à 12.000 g à 4°C est faite pendant 10 minutes et permet de voir apparaître un culot gélatineux.

Lavage de l'ARN

Le surnageant est retiré du tube et le culot d'ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol 75%. Le culot est ensuite resuspendu en mélangeant au vortex et le tube est centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C .

Re-dissolution de l'ARN

Le culot est séché à l'air ambiant puis est re-dissout dans 10-20µL d'eau (exempte d'ARNase). Le tout est incubé à 55-60°C pendant 10 minutes.

1.5.14.2 RT-PCR

Une fois que l'ARN total est extrait, on procède à sa transcription inverse pour synthétiser un premier brin d'ADNc. Sa concentration était d'abord mesurée au spectrophotomètre puis diluée à 0,4 µg/µL. Les réactifs suivants étaient ensuite ajoutés dans un tube (nuclease free microcentrifuge tube): 2 µL Oligo(dT)₁₆ (Perkin Elmer, Norwalk, CT), 2 µg d'ARN total et 10 µL d'eau distillée. Ils étaient ensuite incubés à 70°C pendant 10 minutes, puis conservés dans la glace. Au tube

étaient ajoutés 4 µL de la solution tampon (5x First Strand Buffer), 2 µL DTT (0,1 M), 1 µL dNTP (10 mM) et 1 µL d'eau distillée. Le tout était incubé à 37°C pour 2 min puis on lui additionnait 2 µL SuperScript II RT (Invitrogen).

Pour la PCR, les réactifs suivants étaient utilisés : 2 µL d'ADNc, 5 µL solution tampon 10X PCR Buffer (GibcoBRL), 1,5 µL MgCl₂ (50 mM, GibcoBRL), 1 µL dNTP Mix (10 mM, GibcoBRL), 2,5 U Taq DNA Polymerase (5 U/µL, GibcoBRL) , 2 µL des quatre amorces et l'eau distillée.

Deux amorces étaient utilisées pour amplifier une séquence de 380 pb (de 3460 à 3840) dans la région 3' du gène *atp7b*, séquence qui est absente chez les rats LEC non transplantés. Pour cette région, l'amorce sens était 5'- CCA TCT CCA GTG ACA TCA G -3' et l'amorce anti-sens était 5'- AGT CCC AAT AGC AAT GCC -3'.

Deux autres amorces pour la β-actine étaient utilisées comme contrôle interne de la technique. Elles amplifiaient un segment de 188 pb. L'amorce sens était 5'- AGG CAT ACA GGG ACA ACA C- 3' et l'amorce anti-sens était 5'- GGA GAA GAT TTG GCA C CA C -3'.

La PCR était effectuée pendant 40 cycles sous les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pour 1 min, hybridation à 60°C pour 1 min et élongation à 72°C pour 2 min.

La séparation, détection et quantification des produits de PCR s'est effectuée grâce au Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) et DNA 500 LabChip kit. Cette technique a été basée sur celle décrite par Gottwald et al ⁴³.

1.5.15 Immunohistochimie

La production de l'anticorps anti-atp7b a été faite en conjuguant un peptide synthétique (Research Genetics, Huntsville, AL) représentant la séquence terminale C (acides aminés 1366-1386) de l'atp7b avec l'albumine bovine (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Ceci a ensuite été utilisé pour immuniser des lapins (New Zealand White rabbits) (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN). Cette séquence a été choisie à cause de son homologie avec celle de l'ATP7B. 150 µg de l'anticorps anti-atp7b ont été injectés 3 fois aux lapins (semaines 0, 4, 6).

Pour préparer les coupes de paraffine à l'immunohistochimie, celles-ci ont été sectionnées à une épaisseur de 5 µm dans le cryostat. Une déparaffinisation et une réhydratation ont ensuite été effectuées. Les coupes ont été incubées à 55°C pendant 10 minutes puis placées dans une solution de xylène (5 min, 2 fois). Un transfert est ensuite fait dans les solutions suivantes : éthanol 100% (3 min, 2 fois), éthanol 95% (3 min, 2 fois), éthanol 80% (3 min, 1 fois), éthanol 50% (3 min, 1 fois). Un lavage à l'eau distillée est fait (3 min, 2 fois) puis les coupes sont placées dans une solution de trypsine 0,1% à 37°C pendant 1 heure et relavées dans l'eau distillée pour 3 min. Les sections sont ensuite incubées dans une solution de H₂O₂ 3% pour 10 min afin de bloquer l'activité peroxydase endogène, puis lavées avec du PBS (5 min, 2 fois). Pour colorer les coupes avec l'anticorps anti-atp7b, celles-ci ont été fixées avec un mélange acétone-méthanol (3 :1, v/v) (Seaster Chemicals, Pittsburgh, PA) à -20°C pendant 20 minutes, puis lavées avec du PBS (5 min, 3 fois) et incubées avec l'albumine bovine 3% (Sigma Chemica, St. Louis, MO) pendant 30 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite ré-incubées avec l'anticorps primaire (dilué avec l'albumine bovine 3%/PBS, 1 :100, 4°C, une nuit) puis

lavées avec du PBS (10 min, 3 fois). Une autre incubation est faite avec l'anticorps secondaire marqué à la fluorescéine (FITC) ou à la peroxidase (HRP) (dilué avec l'albumine bovine 3%/PBS, 1 :500, température ambiante, 30 min) suivi d'un lavage avec du PBS (10 min, 3 min). Les sections sont ensuite traitées au Vectashield Mounting Medium H-100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Pour la détection des anticorps conjugués à la peroxidase, une coloration a été faite à l'aide du kit HRP-DAB (Sigma, U-5005, D-9167), suivie d'une coloration à l'hématoxyline et d'une préservation avec du Permount Mounting Medium (Fisher Scientific, SP15-100).

1.5.16 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm déviation standard. Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du programme SPSS (SPSS, Chicago, IL). Le test de Student a été utilisé pour comparer les concentrations de cuivre biliaire et hépatique. Le test de Student apparié a été utilisé pour comparer l'activité oxydase de la céruloplasmine pré et post-transplantation pour les rats du groupe 1. La différence jugée statistiquement significative était de 5% ($p < 0,05$).

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

2.1 Données du groupe 1

Le tableau II résume les données des 12 rats transplantés.

TABLEAU II
DONNÉES PORTANT SUR LES 12 RATS TRANSPLANTÉS (GROUPE 1)

Rat	Sexe	Chirurgie	Transplantation (hépatocytes/mL)	Viabilité cellulaire	Collagénase (g/500mL)	Sacrifice	Hépatite
1	F	15/04/2001 (5 sem)	$2,0 \times 10^6$	63%	0,2	6/08/2001 (21 sem)	9/06/2001 (13 sem)
2	M	20/05/2001 (8 sem)	$2,6 \times 10^5$	81%	0,13	16/09/2001 (25 sem)	
3	M	19/05/2001 (8 sem)	$2,3 \times 10^6$	31,5%	0,13	3/09/2001 (23 sem)	
4	M	19/05/2001 (8 sem)	$2,3 \times 10^6$	31,5%	0,13	3/09/2001 (23 sem)	
5	M	20/05/2001 (8 sem)	$2,6 \times 10^5$	81%	0,13	16/09/2001 (25 sem)	23/07/2001 (17 sem)
6	M	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	3/10/2001 (23 sem)	
7	M	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	3/10/2001 (23 sem)	
8	M	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	3/10/2001 (23 sem)	
9	M	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	3/10/2001 (23 sem)	
10	F	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	10/10/2001 (23 sem)	3/08/2001 (13 sem)
11	F	11/06/2001 (7 sem)	$5,4 \times 10^6$	80%	0,12	10/10/2001 (23 sem)	14/08/2001 (14 sem)
12	M	26/06/2001 (6 sem)	$3,6 \times 10^7$	94%	0,14	24/11/2001 (27 sem)	

2.2 Poids

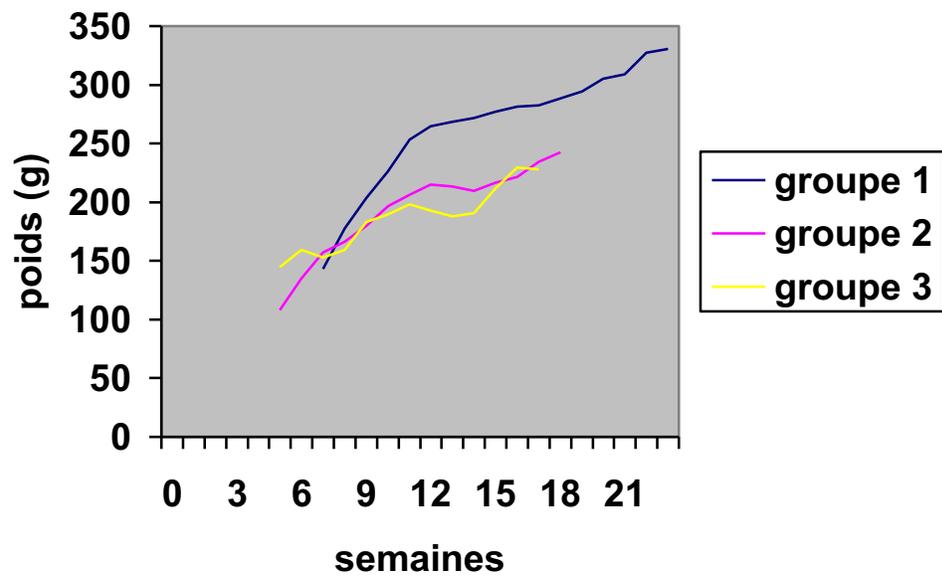


FIGURE 7 : Courbes de poids

2.3 Tests de fonction hépatique

TABLEAU III
Hépatites biochimiques et cliniques

	<i>Nombre d'hépatites biochimiques (%)</i>	<i>Nombre d'hépatites cliniques (%)</i>
Groupe 1	11 (92%)	4(33%)
Groupe 2	4 (67%)	0
Groupe 3	2 (33%)	2 (33%)

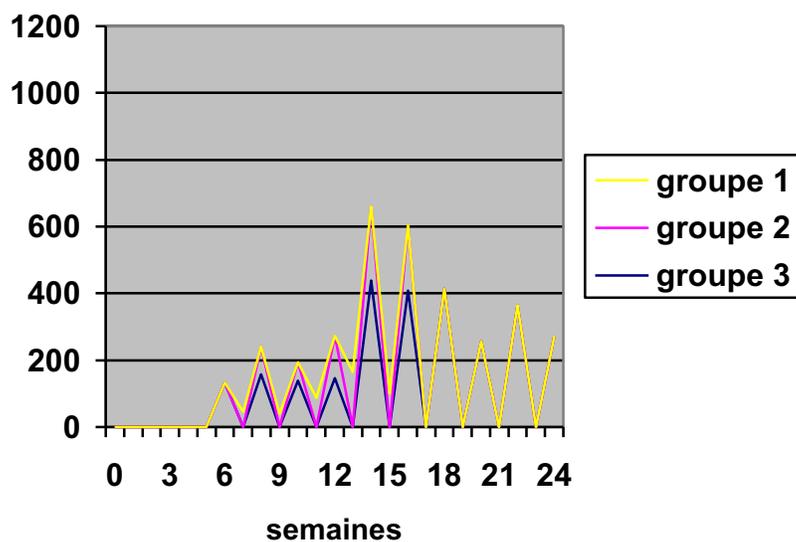


FIGURE 8 : Courbes de l'AST

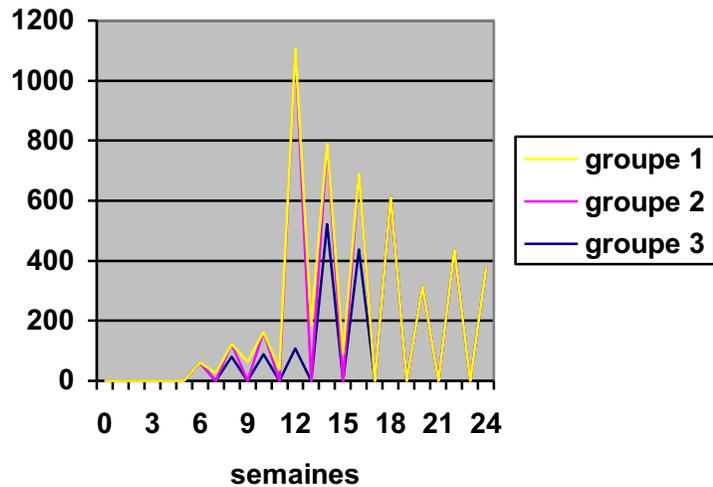


FIGURE 9 : Courbes de l'ALT

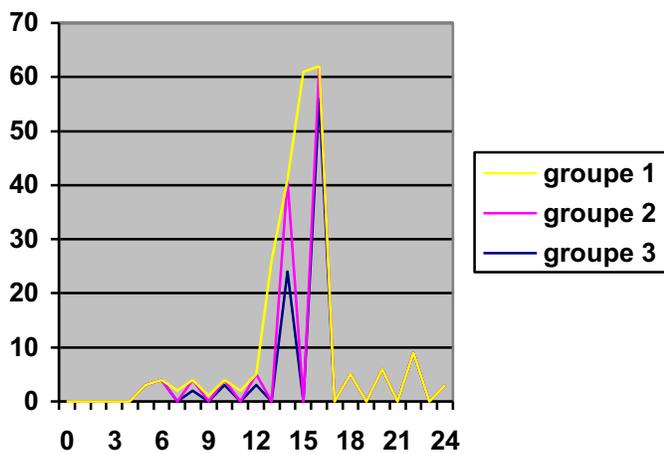


FIGURE 10 : Courbes de la bilirubine

2.4 Activité oxydase de la céruloplasmine

L'activité oxydase de la céruloplasmine (AOC) pré-transplantation et post-transplantation des rats du groupe 1 a été comparée à l'aide du test de Student apparié. L'AOC post-transplantation est significativement augmentée par rapport à l'AOC pré-transplantation.

TABLEAU IV

Activité oxydase de la céruloplasmine des rats transplantés (groupe 1) :
pré et post-transplantation

Rats	AOC pré-transplantation	AOC post-transplantation
1	29,375	66,2
2	1,25	20
3	8,75	88,7
4	25,625	20
5	0	59,3
6	0	100
7	1,25	50,6
8	11,25	33,8
9	26,875	31,3
10	1,25	30,8
11	0	3,75
12	1,25	90,6
	8,9 ± 11,7	49,6 ± 31,5

TABLEAU V

Activité oxydase de la céruloplasmine des rats contrôles (groupe 2)

Rats	AOC
1	24,75
2	20,315
3	0
4	7,187
5	0
6	8,437
	10,1 ± 9,3

TABLEAU VI

Activité oxydase de la céruloplasmine des rats contrôles (groupe 3)

Rats	AOC
1	23,475
2	11,3
3	0
4	7,875
5	8,75
6	0
	8,6 ± 4,5

2.5 Concentration du cuivre biliaire et hépatique

TABLEAU VII
Concentration du cuivre biliaire & hépatique au moment du sacrifice

Groupe 1

Rats	Cuivre biliaire ($\mu\text{mol/L}$)	Cuivre hépatique ($\mu\text{mol/g}$)
1	2,3	16,4
2	7,2	1,2
3	7	11,7
4	18,1	4,1
5	4,5	12,1
6	27,7	4,5
7	10,2	19,6
8	5,9	14,5
9	10,2	11,9
10	3,2	17,7
11	3	22,8
12	12,3	9,8
	9,3 \pm 7,4	12,2 \pm 6,6

Groupe 2

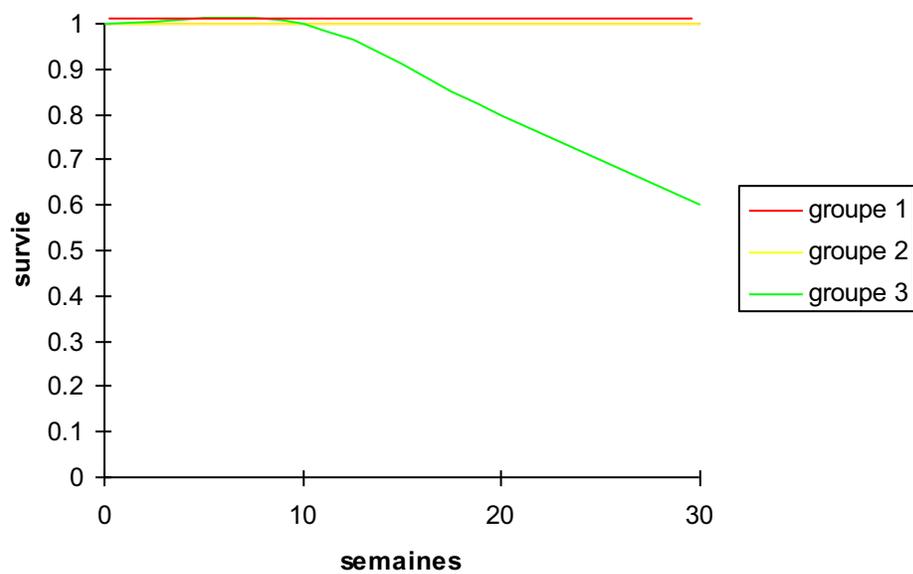
Rats	Cuivre biliaire ($\mu\text{mol/L}$)	Cuivre hépatique ($\mu\text{mol/g}$)
1	11,18	11,53
2	10,66	14,08
3	1,84	9,61
4	11,19	9,76
5	-----	-----
6	2,88	8,48
	7,6 \pm 2,3	10,7 \pm 3,6

Groupe 3

Rats	Cuivre biliaire ($\mu\text{mol/g}$)	Cuivre hépatique
1	6,05	8,28
2	0,71	13,23
3	-----	-----
4	-----	-----
5	1,32	10,13
6	12	13,96
	$5,0 \pm 5,4$	$11,4 \pm 2,8$

2.6 Survie des rats

FIGURE 11: Courbes de survie



2.7 Histologie

TABLEAU VIII : Histologie des foies

	<i>Groupe 1</i>	<i>Groupe 2</i>	<i>Groupe 3</i>
Ploidie	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Stéatose	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Apoptose	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Mitose	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Prolifération cholangiolaire	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Fibrose	Légère	Modérée à sévère	Modérée à sévère
Tumeur	0/6	5/6	4/6

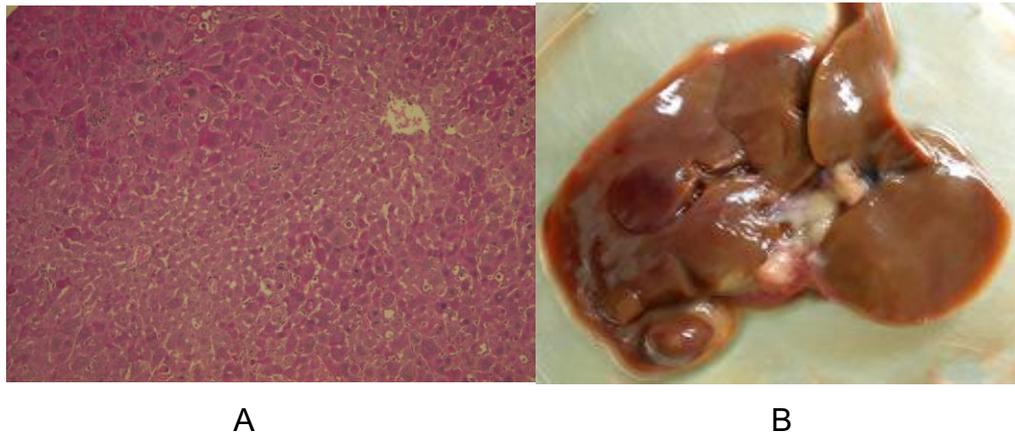


FIGURE 12: Rat transplanté (groupe 1)

Dans cette image (A), on remarque la présence d'îlots d'hépatocytes normaux dans les espaces périportaux (grossissement x 400). Vue macroscopique du foie (B).

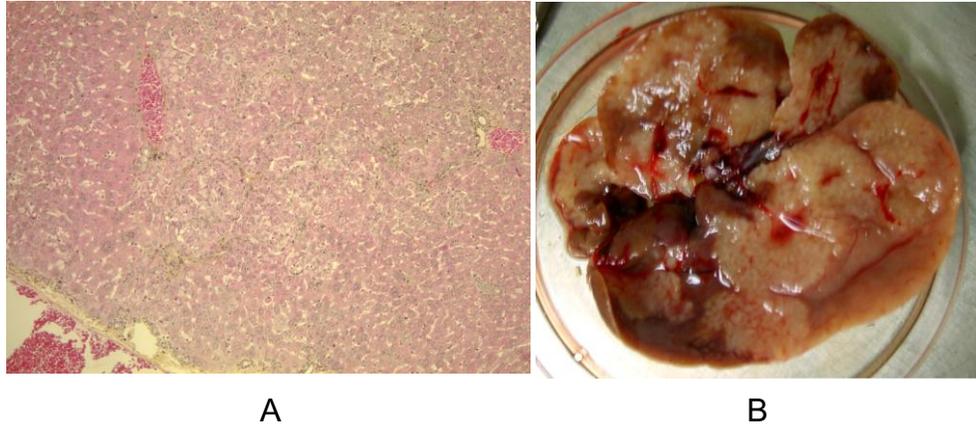


FIGURE 13: Rat contrôle

La présence de fibrose et de stéatose est plus marquée, de même que celle de nodules hyperplasiques (grossissement x 400)(A). Vue macroscopique du foie (B) montrant l'infiltration importante par une tumeur.

2.8 Détection de l'ARNm de l'atp7b

Selon les analyses de RT-PCR, aucun rat des groupes contrôles ne possédait l'atp7b, tel que prévu. En revanche, 7 des 12 rats transplantés (58%) le possédaient. Leurs taux d'expression du gène atp7b comparé à celle d'un rat normal LE étaient de $11,9 \% \pm 13,6$ (tels que calculés par le Bioanalyseur Agilent 2100). Le plus haut taux d'expression du gène s'affichait à 42.2%, tandis que plusieurs étaient inférieurs à 10%.

TABLEAU IX : Taux d'expression du gène atp7b (groupe 1)

RATS	RT-PCR
1	0
2	8,9
3	17,6
4	0
5	0
6	42,2
7	24,6
8	17,8
9	7,2
10	0
11	0
12	24,5

$11,9 \pm 13,6$

2.9 Immunohistochimie

L'immunohistochimie effectuée avec l'anticorps produit contre la partie C-terminale de l'atp7b a montré que les rats contrôles n'avaient aucune cellule positive comme cela était attendu. Les rats transplantés avaient quant à eux des foies partiellement repeuplés de cellules exprimant le gène en question. Cette repopulation avait un profil de distribution variable à travers le foie, ainsi qu'à travers les différents lobes.

Cette deuxième méthode pour détecter la présence de la protéine atp7b dans les foies transplantés a démontré que le gène était présent chez tous les rats transplantés, malgré qu'il était parfois indétectable par la méthode de RT-PCR.

La figure 12 est un exemple de cette technique faite sur le foie d'un des rats transplantés.

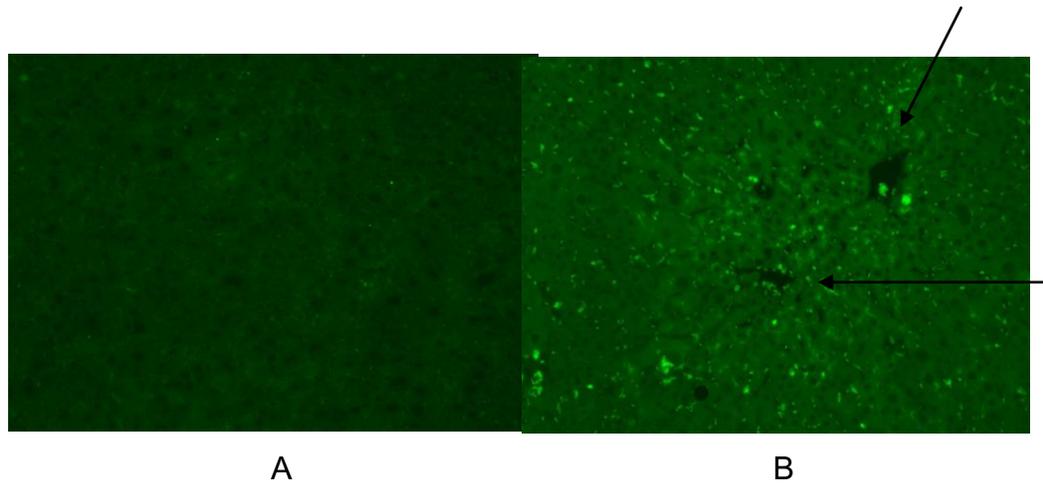


FIGURE 12 : Immunohistochimie

Le foie d'un rat contrôle n'affiche pas de cellules positives (A). A l'opposé, le foie d'un rat transplanté montre la présence de l'atp7b (B) et celle-ci est notée principalement dans les régions périportales (flèches)(grossissement x 400).

CHAPITRE 3 DISCUSSION

Cette étude sur la transplantation d'hépatocytes a permis de démontrer qu'elle permet d'améliorer certains aspects qui caractérisent les rats LEC (acquisition du gène *atp7b*, histologie, activité oxydase de la céruloplasmine, survie). Ces données s'étendent indirectement à la maladie de Wilson, puisqu'ils en sont les modèles animaux. D'autres aspects (concentration du cuivre biliaire et hépatique, apparition d'une hépatite biochimique, prise de poids) sont demeurés inchangés, ce qui ne diminue toutefois pas le mérite de cette technique qui sera à approfondir ultérieurement. Des commentaires sur chacun de ces points étudiés seront donnés, et ceci sera suivi par une discussion sur la transplantation d'hépatocytes de manière plus globale.

Acquisition du gène *atp7b*

La présence du gène *atp7b* dans les foies est un indice que la transplantation a permis d'implanter une quantité minimale de cellules saines chez des rats avec la maladie de Wilson. Elle a été vérifiée en investiguant son ARNm par RT-PCR ainsi qu'en recherchant sa protéine *atp7b* en utilisant l'immunohistochimie.

Pour ce qui est de son ARNm, celui-ci a été démontré chez 7 des 12 rats transplantés (58%). Cependant, le taux d'expression obtenu n'était pas élevé (11,9% par rapport à un rat LE normal). Ceci est toutefois comparable aux taux obtenus dans certaines études par des équipes ayant tenté la transplantation d'hépatocytes chez les rats LEC. En 1996, l'équipe du Dr Ogawa a eu un taux d'ARNm entre 4-20% en faisant une étude à similaire à celle décrite ici⁴⁴. Ils ont par contre transplanté des hépatocytes de nouveaux-nés dans la veine

mésentérique après une hépatectomie de 60% et recherché l'ARNm de l'atp7b lors du sacrifice à 30 semaines.

Le groupe dirigé par le Dr Gupta a lui aussi conduit des études sur ce sujet. En 2001, il a publié les résultats de transplantations par injection intra-splénique chez des rats LEC qui recevaient 2 doses de rétroisine intra-péritonéale⁴⁵ suivies d'une hépatectomie de 60%. La rétroisine était utilisée pour préconditionner le foie. Elle est un agent alcaloïde bloquant le cycle cellulaire des hépatocytes. Elle empêche la division cellulaire après l'hépatectomie, ce qui donne un avantage sélectif de prolifération aux cellules normales transplantées puisqu'elles n'ont pas été soumises à la rétroisine. Les taux d'expression du gène obtenus étaient de <25% à 6 sem, 26-40% à 4 mois et 74-100% après 6 mois, ce qui est beaucoup plus élevé que les taux obtenus dans notre étude. Les taux à 4 et 6 mois sont remarquables mais on ne sait toutefois pas combien de rats les ont atteints. Ce même groupe a publié une autre étude l'année suivante concernant le besoin de préconditionnement des foies à transplanter dans le cas où la transplantation se faisait à un très jeune âge (rats LEC de 2 sem)⁴⁶. Ils ont transplantés des jeunes rats qui n'ont pas été préconditionnés. L'ARNm de l'atp7b n'était pas détectable à 5 mois mais l'était dans 64% des rats après 18-20 mois, allant de 53-116% par rapport à un rat LEA. Il s'agit de l'étude où les taux obtenus ont été les plus élevés. En effet, ces taux n'ont été reproduits nulle part ailleurs. Il est aussi à noter qu'en transplantant 10^7 cellules, ceci correspond à environ 2% de la masse hépatique du rat. On estime que seulement 20-30% des cellules transplantées vont effectivement s'implanter dans des conditions idéales. Donc une injection de 10^7 cellules ajoutera approximativement 0,5% à la masse cellulaire, ce qui est relativement faible⁴⁷.

Dans l'étude que nous présentons, la recherche de l'atp7b par immunohistochimie s'est révélée positive chez tous les rats transplantés. Le fait que la détection de son ARNm n'a pas porté fruit chez tous les rats transplantés (58% par RT-PCR vs 100% par immunohistochimie) montre donc que l'utilisation d'une seule technique n'était pas suffisante pour prouver que les cellules transplantées se sont bel et bien implantées dans le foie receveur. Des erreurs dans la technique de RT-PCR sont à considérer largement pour expliquer pourquoi la discordance entre les résultats de ces 2 techniques était aussi importante. Il est très probable qu'un défaut dans la technique s'est produit chez plus d'un rat ayant eu un RT-PCR négatif.

D'autre part, les cellules transplantées ont été retrouvées principalement sous forme de nodules lors de l'analyse histologique des foies. Ces nodules étaient distribués de façon hétérogène à travers le foie. Des coupes histologiques faites aux sites dépourvus de nodules ont peut-être été parfois réalisées. Ceci peut aussi expliquer les résultats divergents entre la RT-PCR et l'immunohistochimie.

Finalement, le fait que nos résultats par RT-PCR démontraient une grande variabilité (0-42%) soulève possiblement un doute sur la fiabilité de cette technique. En effet, non seulement certains résultats étaient de 0%, mais aussi d'autres étaient très faibles (< 10%) avec un pic isolé à 42% chez seulement un rat.

Histologie

L'examen histologique des foies transplantés a démontré une amélioration sur tous les critères. Le processus inflammatoire, le degré de stéatose, d'apoptose et de mitose étaient diminués par rapport au foies non transplantés. Ceci montre une tendance à avoir moins de dommages cellulaires (de même que moins de signes indirects de dommages tels le degré de mitose, stéatose et inflammation) grâce à la transplantation, ou du moins un ralentissement au développement de ces dommages.

Les caractéristiques des hépatocytes des rats LEC non traités sont bien décrites dans la littérature⁴⁶. On note une polyploïdie importante, une mégalocytose, de la cholangiofibrose, des cellules ovalaires, de l'apoptose et une activité mitotique accrue.

Les rats LE normaux n'ont pas de prolifération des canaux biliaires ni de cholangiofibrose. Certains hépatocytes peuvent montrer de la polyploïdie ainsi qu'une stéatose de façon occasionnelle mais la grande majorité des cellules n'affiche aucun signe de dommage cellulaire.

Les rats LEC transplantés présentent des caractéristiques histologiques à mi-chemin entre celles des rats LE normaux et celles des rats LEC non traités. Dans notre étude, aucun de ces rats n'a développé de tumeur hépatique au moment du sacrifice, vers l'âge de 6 mois. Les réponses ont cependant varié d'un rat à l'autre et les cellules transplantées étaient le plus souvent regroupées en nodules de quelques cellules à plusieurs cellules, surtout dans les espaces périportaux. Quelques hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la variabilité des réponses. Le foie d'un rat LEC montre des

anomalies histologiques dues à l'accumulation chronique de cuivre et ces anomalies, absentes chez le rat nouveau-né, apparaissent et deviennent de plus en plus marquées au fur et à mesure que le rat vieillit. La fibrose, de même que les taux élevés de cuivre hépatique, pourrait interférer avec l'implantation des hépatocytes. L'accumulation excessive de cuivre pourrait également altérer les composantes de la matrice extracellulaire et empêcher l'adhérence des cellules transplantées. De plus, des études ont déjà montré que la concentration élevée de cuivre extracellulaire retarde, et parfois même, inhibe la prolifération cellulaire.

Les hépatocytes transplantés font donc face à plus d'obstacles pour s'implanter et proliférer dans un foie endommagé. La transplantation cellulaire à un stade précoce (avant l'apparition des dommages) est probablement souhaitable. D'autre part, il est aussi possible que certaines populations cellulaires telles les cellules souches aient une meilleure capacité d'implantation dans ce type de milieu.

Activité oxydase de la céruloplasmine

L'activité oxydase de la céruloplasmine (AOC) a été améliorée de façon significative chez les rats qui ont été transplantés ($49,6 \pm 31,5$ versus $8,9 \pm 11,7$). Elle est un indicateur indirect du taux sanguin de céruloplasmine. Son augmentation laisse donc supposer que l'apo-céruloplasmine est moins dégradée qu'à l'habitude à cause de la présence de l'atp7b. Considérant que la valeur normale de l'AOC (chez un rat normal) se situe entre 62 et 140 U/L, 5 des 12 rats ont eu une amélioration significative de leur AOC post-transplantation malgré que cette valeur demeurait inférieure à la valeur normale. Seulement 3 de

ces rats n'ont pas eu d'augmentation notable de leur AOC, ce qui donne une réussite chez 9 sur 12 rats, soit 75% de succès.

Mesure de la concentration du cuivre (biliaire et hépatique)

Même si cette étude s'est terminée par une survie de 100% laissant supposer que la capacité fonctionnelle des cellules transplantées a été transférée aux rats, ceci n'a pas été réflété dans les mesures de concentration du cuivre biliaire et hépatique : il faut se demander si une transplantation effectuée avant l'apparition des dommages (avant l'âge de 5 semaines) donnerait de meilleurs résultats quant à l'AOC post-transplantation, les concentrations de cuivre et le taux d'expression du gène. Chez les rats LEC, la concentration toxique du cuivre hépatique est déjà atteinte dès l'âge de 12 sem (40 fois la concentration du cuivre hépatique des rats LEA), ce qui correspond cliniquement à la période précédant tout juste l'apparition de l'hépatite⁴⁸. Les changements pathologiques dans le foie sont par contre détectables beaucoup plus tôt, dès 5 semaines de vie en microscopie électronique⁴⁹ (surtout la ségrégation des nucléoles) et dès 8 semaines de vie en histologie, et ils progressent avec le temps jusqu'à la manifestation clinique d'une hépatite.

Encore une fois, il apparaît logique de dire que transplanter des cellules avant que le processus de dommage cellulaire n'ait été amorcé soit nécessaire pour obtenir l'effet escompté. Nos transplantations se sont effectuées alors légèrement en retard (entre 5-8 semaines) et ceci pourrait possiblement expliquer en partie l'absence d'une amélioration significative. Cependant, la mortalité opératoire était trop élevée si les

hépatectomies et transplantations s'effectuaient chez des rats âgés de moins de 5 semaines.

Hépatite

Dans cette étude, presque tous les rats transplantés ont souffert d'une hépatite biochimique (augmentation des enzymes hépatiques en l'absence de signes cliniques). Cette hépatite survenait entre la 14^e et la 23^e semaine de vie. Parmi ces rats, 4 d'entre eux ont également eu une hépatite clinique qui a précédé l'hépatite biochimique de quelques semaines. L'hépatite clinique se produisait à 13 sem (1 rat), 14 sem (2 rats) et 18 sem (1 rat). Dans tous les cas, l'hépatite clinique s'est spontanément résolue en-dedans de 2 semaines et la perte de poids associée à cette période a été transitoire. Ceci constitue une amélioration par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature chez les rats LEC. En effet, on sait que la grande majorité des rats LEC (80%) développent une hépatite vers l'âge de 16 sem en moyenne, dont la plupart en mourront quelques jours plus tard. Cependant, nos rats contrôles ont eu moins d'hépatites et une mortalité moindre par rapport à celles rapportées dans la littérature (groupe 2 : hépatite 67% et mortalité 0%, groupe 3 : hépatite 33% et mortalité 33%). Pour le groupe 1, il est possible que la transplantation a permis aux rats de maintenir un niveau de cellules fonctionnelles au-dessus du seuil critique et ainsi empêcher le décès chez les 4 rats ayant souffert d'une hépatite clinique ainsi que de retarder l'apparition d'une hépatite chez les autres rats. Etant donné qu'il s'agissait d'une étude sur l'évolution à court terme des rats transplantés, il n'est pas possible de commenter sur l'effet de la transplantation sur le développement à long terme d'un hépatome.

Survie

Au niveau de la survie de 100% à 6 mois obtenue chez les rats transplantés, celle-ci est nettement supérieure à celle rapportée dans les études portant sur les rats LEC. La survie des rats contrôles était également élevée cependant. En effet, le groupe 2 (rats avec hépatectomie seule) a eu une survie de 100% alors que le groupe 3 (rats n'ayant eu aucune manipulation) a eu une survie de 66%, les décès étant survenu à 3 mois et 3,5 mois de vie secondairement à des hépatites fulminantes. Les études japonaises sur les cohortes de rats LEC montrent des survies moyennes de seulement 30-40% à 4 mois de vie, ce qui est une différence considérable avec celle observée dans les 2 groupes contrôles de cette étude.

La survie des rats contrôles s'apparente à celles mentionnées par les groupes américains⁴⁵⁻⁴⁶ d'environ 75-84% à 5-6 mois, sans que des explications ne soient proposées concernant cette énorme différence. Il est probable que le fait de croiser tous les rats LEC avec des rats LE a certes permis de maintenir et grossir la colonie durant de nombreuses années mais cela a peut-être aussi permis de rendre les rats plus résistants également. D'un autre côté, la survie mentionnée dans les études japonaises est basée sur les cohortes de rats étudiées dès leur naissance. Puisque nos rats n'ont été sélectionnés qu'après l'âge de 5 semaines, tous les décès des rats contrôles âgés de 0-5 semaines n'ont pas été comptabilisés, d'où un taux de survie artificiellement plus élevé. En effet, il a été noté qu'une partie de la progéniture des femelles qui accouchaient décédait peu après leur naissance (dans les premiers jours de vie). Malgré que leur génotype n'était pas vérifié, il était extrêmement probable que la plupart des décès survenaient chez les rats LEC «homozygotes » (i.e. porteurs de la mutation), puisque la proportion de ces rats était habituellement très

faible lors du génotypage (< 25%). Rappelons que les rats LEC « homozygotes » sont en fait les véritables rats LEC. En effet, pour maintenir la colonie de rats LEC, il a fallu les croiser avec des rats LE, qui sont des rats normaux (sans mutation). Toute leur progéniture a donc été soumise à un génotypage pour déterminer lesquels étaient porteurs de la mutation (que nous appelons ici « homozygotes ») et qui alors étaient les véritables rats LEC qui allaient constituer nos 3 groupes cibles dans l'étude.

La constatation que le groupe 2 (rats hépatectomisés mais non transplantés) ait tout de même obtenu une meilleure survie que le groupe 3 soulève la question de l'effet de l'hépatectomie. Des études ont rapporté que l'induction de la régénérescence hépatique (que ce soit par hépatectomie partielle ou la prise d'agents tels la D-galactosamine) a un effet préventif significatif sur les dommages cellulaires dans les foies de rats LEC, particulièrement si l'induction de la régénérescence s'est faite avant l'apparition de l'hépatite. Dans le cas de l'hépatectomie partielle, la concentration hépatique du cuivre serait réduite de moitié par rapport aux rats contrôles ⁸⁴.

De plus, certains auteurs ont trouvé qu'une induction de la régénérescence par la D-galactosamine inhibe la production de radicaux libres causée par l'excès de cuivre⁸⁵. Il pourrait en être de même si l'induction était causée par une hépatectomie partielle.

Les métallothionéines joueraient aussi un rôle prépondérant dans la régénérescence hépatique ⁸⁶⁻⁸⁸ après une hépatectomie partielle et leur production serait augmentée. Il se pourrait alors qu'elles lient le cuivre en plus grande quantité et que les cellules utilisent cette voie alternative pour tenter de préserver l'homéostasie du cuivre.

Enfin, d'autres causes peuvent aussi expliquer la non-amélioration des paramètres fonctionnels étudiés. Outre le moment choisi pour transplanter les cellules, le nombre d'hépatocytes transplantés de même que leur viabilité au moment de la transplantation sont des éléments cruciaux. Les transplantations se sont effectuées avec en moyenne $6,7 \times 10^6$ hépatocytes ayant une viabilité cellulaire variant de 32% (2 rats) à 94%. On ne s'attendait donc pas à retrouver une quantité appréciable de cellules greffées chez les 2 rats transplantés avec une préparation de faible viabilité et cela pourrait aussi expliquer pourquoi l'un de ces rats a fait une hépatite clinique. Au niveau pratique, il semble difficile d'augmenter de façon substantielle la quantité d'hépatocytes à transplanter par injection intra-splénique puisque la rate a une capacité limitée. Par contre, la viabilité cellulaire est une variable dont la qualité est primordiale et est affectée uniquement par la performance technique qui est toujours possible à améliorer.

LA TRANSPLANTATION D'HÉPATOCYTES

Biodistribution et risques d'embolisation

Des études de biodistribution des hépatocytes post-injection intra-splénique chez des rats normaux ont démontré qu'environ 10% des hépatocytes demeuraient dans la rate, 60% des hépatocytes migraient au foie et 1-3% des hépatocytes migraient vers les poumons. Ces études étaient réalisées en marquant les hépatocytes avec de l'indium ($^{111}\text{indium}$) ou du technécium ($^{99\text{m}}\text{technécium}$)⁵⁰. Les études faites chez les rats avec une hypertension portale démontrent que la proportion de cellules transloquant vers le foie est inférieure et que plus

de cellules migrent vers les poumons. Les proportions rapportées sont d'environ 54% dans le foie, 11% dans la rate et 35% dans les poumons⁵¹. On sait que la migration des hépatocytes vers les sinusoides hépatiques via la veine porte se fait presque instantanément après l'injection intra-splénique (chez des rats normaux). Pour ce qui est de la forte proportion d'hépatocytes ayant migré dans la circulation pulmonaire, la complication à craindre est l'embolie pulmonaire. Cependant, les hépatocytes qui auraient migré dans les capillaires pulmonaires seraient rapidement fragmentés et dégradés, et ne seraient quasi plus détectables après 24 heures, ce qui est rassurant. Les risques d'embolie pulmonaire ne seraient donc pas aussi élevés qu'on ne l'aurait crû. Ces trouvailles sont valides tant chez les rats normaux que chez les rats avec hypertension portale. La cinétique de la destruction des cellules transloquées dans les capillaires pulmonaires a aussi été étudiée. Les poumons ne retiendraient que $36 \pm 1\%$ des cellules transplantées après 1 minute, $13 \pm 3\%$ après 6 heures et $3 \pm 0,1\%$ après 24 heures ($p < 0,05$)⁵². D'un autre côté, les changements hémodynamiques provoqués par la migration des hépatocytes vers les poumons ne semblent pas être sévères. Chez les rats normaux, on n'observe pas de changement significatif dans la pression de l'oreillette droite après une injection de 10^7 hépatocytes. Une hypertension pulmonaire transitoire est notée seulement lorsque le double de cette quantité est transplanté, ce qui concorde avec la clairance rapide des hépatocytes dans la circulation pulmonaire. Ceci confère donc une certaine marge de sécurité à cette technique car la plupart des hépatocytes transplantés ayant migré vers les poumons ne causeront pas de séquelles, puisqu'ils seront rapidement dégradés en 24 heures et ne provoqueront qu'une hypertension pulmonaire temporaire si la quantité transplantée est supérieure à 2×10^7 cellules.

Hépatisation splénique

Après l'injection intra-splénique, une faible proportion des hépatocytes demeurera dans la rate et s'y implantera, phénomène appelé hépatisation splénique. Des chercheurs se sont attardés à éclaircir le devenir de ces cellules. Il semblerait que les cellules formeraient de nouveaux canalicules biliaires et démontreraient une architecture normale lorsque les rates sont examinées plus d'un an après la transplantation. Les hépatocytes formeraient à ce moment environ 40% du parenchyme splénique, visibles à l'oeil nu en forme de cordon de couleur grise-blanche et seraient capables même de synthétiser l'albumine et le glycogène. Les organelles seraient aussi identiques à celles des cellules normales et on retrouverait les éléments d'une architecture normale, incluant la formation de sinusoides⁵³⁻⁵⁵. Nous n'avons cependant pas inclus l'examen pathologique des rates des animaux transplantés dans notre étude.

Sites de transplantation

La rate a été choisie comme site de transplantation parce que les résultats obtenus sont rapportés comme étant supérieurs à tous les autres sites. Les cellules transplantées survivent plus longtemps et exhibent des caractéristiques montrant que non seulement elles ont réussi à s'implanter dans un autre milieu, mais en plus qu'elles sont fonctionnelles⁵⁶ (glycogène, albumine, glucose-6-phosphatase, cytochrome P450). Les autres sites de transplantation testés dans différentes études sont la cavité péritonéale, les tissus sous-cutanés, le rein (sous la capsule rénale), le parenchyme pulmonaire, le lit vasculaire pulmonaire ainsi que diverses glandes (salivaire, thymus, thyroïde, pancréas). Des transplantations par injection directe dans la veine porte ont été essayées mais le risque de thrombose veineuse portale et

d'hypertension portale avec ses conséquences (saignement de varices, coagulopathie, insuffisance hépatique aiguë, shunt vers la circulation systémique avec embolie pulmonaire) en restreint l'utilisation chez le rat. Des tentatives ont aussi été réalisées en les combinant avec des îlots pancréatiques, attachées à des matrices ou microencapsulées.

Transplantation d'hépatocytes matures vs transplantation de cellules souches

Dans cette étude, nous avons choisi de transplanter des hépatocytes adultes chez des rats âgés de 5 à 8 semaines. L'aspect portant sur le moment choisi pour transplanter a déjà été discuté antérieurement. Cependant, il est à se demander si les résultats n'auraient pas été supérieurs avec des hépatocytes foetaux ou des cellules souches. On sait que plus les cellules sont jeunes, plus la capacité de régénération est grande. Pour que les hépatocytes matures parviennent à repopuler un foie, certaines conditions sont nécessaires. Le foie receveur doit avoir des dommages extensifs ou bien ses propres cellules doivent être incapables de se diviser pour que les cellules transplantées aient un avantage sélectif à proliférer. La culture des hépatocytes matures est possible mais limitée, et il a été difficile d'introduire des gènes dans ces cellules in vitro pour des fins thérapeutiques. Il a aussi été démontré que les cellules souches hématopoïétiques ou de la moelle pouvaient se différencier en hépatocytes après leur transplantation. Pour toutes ces raisons, la transplantation de cellules souches continue à exercer un attrait grâce à son potentiel supérieur de régénération cellulaire⁵⁷.

Facteurs stimulant la prolifération des cellules transplantées

Pour que les hépatocytes transplantés soient stimulés à proliférer, nous avons effectués une hépatectomie partielle chez tous les rats. Cependant, il s'agit d'une procédure très invasive et dans le contexte où les études sont faites afin de pouvoir un jour les appliquer chez l'homme, il serait donc préférable de trouver un autre moyen de stimulation. En effet, dans le cas où la transplantation d'hépatocytes échouerait, il serait catastrophique pour un patient d'avoir subi au préalable une hépatectomie partielle. D'autres moyens ont été tentés pour stimuler les hépatocytes transplantés à proliférer, la rétroisine étant un de ceux-ci mais les conséquences en cas d'échec de la transplantation seraient là-aussi très néfastes pour les patients⁵⁸. Cet agent est métabolisé dans le foie en des métabolites actifs qui vont alkyler les protéines et l'ADN. Il arrête la cellule en phase S et G2. Malgré que la rétroisine est métabolisée rapidement, ses effets sur le cycle de prolifération peuvent durer plusieurs semaines, voire des mois. L'ajout de facteurs stimulant la prolifération a aussi été essayé, par exemple l'hormone thyroïdienne T₃ et les facteurs de croissance HGF (hepatocyte growth factor) et HSS (hepatocyte stimulatory substance), ce qui a donné des résultats prometteurs⁵⁹⁻⁶¹ jusqu'à maintenant.

Immunosuppression

L'immunosuppression a dû être maintenue chez les animaux transplantés avec des cellules allogéniques. Cependant, peu de données sont disponibles, notamment à propos du type d'immunosuppresseur, sa dose, fréquence et durée d'administration nécessaire. Le tacrolimus a été utilisé dans cette étude et les injections se faisaient de façon intrapéritonéale. Les autres façons d'éviter un rejet sont l'immunomodulation (par irradiation), l'utilisation de

microtransporteurs et l'immunoisolation par encapsulation. Ces techniques ont eu des résultats variables selon les études. Quant à l'immunosuppression, certains auteurs ont d'ailleurs même soulevé la question de la nécessité ou non d'immunosupprimer les rats. Dans cette étude, tous les rats transplantés (groupe 1) ont été immunosupprimés. Cependant, puisque les rats donneurs étaient de souche LE et que les rats LEC étaient croisés avec des rats LE de façon routinière pour maintenir la colonie, il est fort possible que les cellules transplantées n'étaient plus immunogènes pour les rats du groupe 1. La nécessité d'immunosupprimer ces rats peut donc être remise en question. L'application de l'immunosuppression chez l'homme est par contre mieux étudiée. A cause de ses nombreux effets secondaires possibles, il serait souhaitable de ne pas y avoir recours. La recherche sur l'auto-transplantation des hépatocytes apporterait alors d'énormes bénéfices.

Cryopréservation des hépatocytes

Etant donné la rareté des organes disponibles, il arrive que des patients en insuffisance hépatique aiguë ou fulminante décèdent avant de recevoir le foie d'un donneur. Plusieurs équipes de chercheurs ont vu les avantages qu'offrait la cryopréservation des hépatocytes et ont tenté de développer cette technique. Tout d'abord, la cryopréservation permettrait d'obtenir une banque de cellules qui seraient disponibles en tout temps. Deuxièmement, ces cellules pourraient également être transplantées en vue de traiter la maladie sous-jacente ou bien servir de pont en attendant la disponibilité d'un foie. Les difficultés principales pour l'utilisation des cellules cryopréservées est d'obtenir une viabilité suffisante lors de la décongélation, ainsi qu'une capacité de régénération et une fonction conservée (surtout au niveau de la

détoxification). Des foies bioartificiels ont même été utilisés avec succès chez quelques patients. Ces systèmes varient quant au type de cellules utilisées (porcine, humaine, lignée cellulaire dérivée de cellules tumorales), leur source (cellules cultivées, cellules cryopréservées, cellules fraîchement isolées), la quantité, la présence et, s'il y a lieu, le type de filtre et la durée du traitement. Plus d'une dizaine de systèmes de foie bioartificiels ont été produits dans le monde (États-Unis, Allemagne, Italie, Chine, Pays-Bas) et même si les résultats sont favorables dans certaines séries, le nombre de cas reste assez limité⁶²⁻⁶⁵.

Thérapie génique

Outre la cryopréservation et la transplantation de cellules jeunes, beaucoup d'espoir repose sur la thérapie génique et la culture des hépatocytes. Pour l'instant, l'isolement des cellules se fait à partir de spécimens de foies réséqués, des segments IV non utilisés lors d'une transplantation⁶⁶ ou des foies rejetés pour la transplantation, la plupart du temps à cause de stéatose importante⁶⁷. Il a déjà été suggéré que la présence excessive de gras diminue la viabilité des cellules isolées et leur capacité à s'implanter⁶⁸. Pour expandre la population cellulaire et produire des cellules immortalisées, une approche possible est la transfection des hépatocytes avec un rétrovirus porteur du gène de l'antigène SV40-large T (simian virus 40 – large tumor) thermolabile, permettant une prolifération cellulaire à 33°C en culture et un arrêt de prolifération entre 37-39°C. Ceci permet d'éviter une prolifération non contrôlée des hépatocytes qui mettrait le patient à risque de développer une néoplasie⁶⁹. Chez l'homme, la thérapie génique pour maladie métabolique a été essayée chez 5 patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale⁷¹⁻⁷². Les hépatocytes des patients

étaient transfectés in vitro avec un vecteur rétroviral portant le gène du récepteur à LDL, puis étaient réinfusés par la veine porte. Les résultats obtenus démontraient l'implantation des hépatocytes et la fonction du transgène. Cependant, il n'y a pas eu d'amélioration significative sur le plan métabolique.

Transplantation d'hépatocytes chez l'humain

Chez l'homme, la transplantation d'hépatocytes a été tentée dans le cadre d'études non contrôlées de petite envergure. Les résultats rapportés sont variables, dans les cas d'hépatite aiguë fulminante et d'hépatite chronique. Certains patients souffrant d'hépatite fulminante ont pu en bénéficier temporairement en attendant de recevoir un foie cadavérique. D'autres patients ont survécu à leur hépatite fulminante suite à la transplantation d'hépatocytes, sans avoir reçu de foie. Comme une guérison spontanée arrive jusque dans 20 à 40% des patients, il n'est donc pas possible d'attribuer la guérison à la transplantation d'hépatocytes⁷⁰.

Les résultats les plus prometteurs sont rencontrés dans les maladies métaboliques. Ces maladies sont regroupées en 2 types : avec atteinte hépatique (déficience en α_1 -antitrypsine, maladie de Wilson, protoporphyrie érythropoïétique, lipidoses, tyrosinémie type 1, cholestase intrahépatique familiale progressive) et sans atteinte hépatique (syndrome de Crigler-Najjar, hypercholestérolémie familiale, syndromes d'hyperammonémie, maladies du métabolisme des carbohydrates). Dans les 2 types, la transplantation orthotopique du foie est le traitement définitif standard, même dans les maladies métaboliques où le foie est normal. Ceci peut paraître drastique, en

particulier pour ces patients, et une façon moins invasive de corriger le défaut génétique est donc souhaitable.

L'étude la plus convaincante a été réalisée aux États-Unis par l'équipe du Dr Fox sur une patiente de 10 ans, atteinte du syndrome de Crigler-Najjar type I ⁷³. Cette maladie résulte d'une absence d'activité de l'UDP-glucuronyltransférase, qui est nécessaire à la conjugation de la bilirubine. A cause des hauts niveaux de bilirubine non conjuguée, les patients sont à risque de kernicterus. Cette étude a démontré une amélioration au niveau de tous les paramètres mesurés (baisse de la bilirubine totale, apparition de bilirubine conjuguée dans la bile), de même qu'une diminution du besoin en phénobarbital et photothérapie. Malgré l'amélioration partielle notée, la patiente a subi une transplantation de foie quatre ans après sa transplantation d'hépatocytes, parce que cette dernière a été jugée non suffisante à améliorer sa qualité de vie.

Les autres études de transplantation d'hépatocytes dans les maladies métaboliques ont donné des résultats variables: 2 patients avec déficience en α_1 -antitrypsine (Strom 1997, Strom 1999)⁷⁴⁻⁷⁵, 3 patients avec déficience en OTC (ornithine transcarbamylase) (Strom 1999, Horslen 2003, Dhawan 2003)⁷⁶, 1 patient avec GSD1a (glycogen storage disease type 1a) (Muraca 2002)⁷⁷, 1 patient avec maladie de Refsum (Sokal 2003)⁷⁸, 2 patients avec déficience en facteur VII (Dhawan 2004)⁷⁹ et 1 patient avec PFIC (progressive familial intrahepatic cholestasis).

En revanche, les résultats des études de transplantation d'hépatocytes dans l'insuffisance hépatique aiguë (Mito 1993, Habibullah 1994, Strom 1997, Bilir 2000, Fisher 2000) et chronique sont

encore plus variables. La transplantation chez les cirrhotiques a tout d'abord été étudiée au Japon chez 10 patients (Mito 1978, Mito 1993)⁸⁰⁻⁸¹. Elle a ensuite été tentée aux États-Unis chez 8 patients avec insuffisance hépatique terminale (Strom 1997)⁸². Il n'est quand même pas si surprenant qu'en présence de cirrhose que la transplantation d'hépatocytes ne permet pas d'améliorer de façon appréciable la pathologie de base. Mais son rôle pourrait certainement être d'agir comme pont temporaire dans l'attente d'une transplantation de foie.

Tout porte à croire que la technique de transplantation de cellules a certainement beaucoup de potentiel chez l'homme, surtout pour le traitement des maladies métaboliques et l'insuffisance hépatique aiguë. Les avantages qu'elle apporterait sont nombreux : 1) Un seul foie permettrait de transplanter des hépatocytes chez plusieurs patients en même temps; 2) Les cellules transplantées pourraient potentiellement prolonger la survie et servir de pont en attendant la disponibilité d'un foie pour une transplantation orthotopique (et peut-être même la rendre non nécessaire, si les cellules transplantées sont capables de procurer du temps additionnel aux hépatocytes natifs pour se régénérer). Dans ce cas, la transplantation d'hépatocytes pourrait être un traitement alternatif à la transplantation d'un foie; 3) Il s'agit d'une procédure moins invasive, moins coûteuse qui permet de laisser en place le foie natif; 4) Elle aiderait à diminuer les listes d'attente pour l'obtention d'un foie; 5) Il serait même possible de faire des transplantations autologues ou de donneurs vivants apparentés; 6) Finalement, la transplantation d'hépatocytes n'interfererait pas avec une transplantation de foie subséquente si nécessaire, ni avec la thérapie génique pour les patients avec maladie métabolique.

CHAPITRE 4: CONCLUSIONS

La transplantation d'hépatocytes adultes chez le rat LEC a donné des résultats mitigés mais encourageants. Certaines données cliniques et biochimiques ont été améliorées de façon significative. Celles qui ne l'ont pas été ont cependant montré une tendance vers l'amélioration, sans être statistiquement significatives.

La transplantation d'hépatocytes n'a jamais été tentée chez des patients souffrant de maladie de Wilson. Notre étude sur les rats LEC est encourageante et il est à se demander si la transplantation d'hépatocytes chez l'homme ne donnerait pas aussi des résultats satisfaisants, du moins de façon temporaire.

Beaucoup de détails seraient cependant à raffiner, notamment le moment exact et le nombre de cellules à transplanter, la possibilité de répéter les transplantations plusieurs fois chez le même patient et l'utilisation d'une immunosuppression.

Une amélioration de la technique de cryopréservation et de culture permettrait d'obtenir une banque d'hépatocytes disponibles immédiatement pour les patients. Une mise au point de la thérapie génique pour le traitement des maladies métaboliques comme la maladie de Wilson sera une percée majeure dans le domaine de la transplantation d'hépatocytes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912; 34:295-509
2. Gitlin N. Wilson's disease: the scourge of copper. *J Hepatol* 1998; 28(4): 734-9
3. Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology* 1980; 78: 1615-28
4. Bearn AG, A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann Hum Genet* 1960, 24: 33-43
5. Frydman M, Bonne-Tammir B, Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S et Goldwitch Z. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1819-21
6. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR et Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5: 327-37
7. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cayanis E, Vitale E, Russo J, Matseoane D, Boukhgalter B, Cao A, Sternlieb I, Evgrafov O, Parano E, Pavone L, Warburton D, Ott J, Penchaszodeh GK, Scheinberg IH et Gilliam TC. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet* 1993; 5:338-43
8. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Ramano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peppercorn J, Bush AI, Sternlieb I, Pirastu M, Gusella JF, Evgrafov O, Penchaszadeh GK, Honig B, Edelman IS, Soares MB, Scheinberg IH et Gilliam TC. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5: 344-50
9. Yamaguchi Y, Heiny ME et Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for

- Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 271-7
10. Youssef ME. Wilson disease. *Mayo Clinic Proceedings* 2003, 78: 1126-36
 11. Riordan SM et Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol.* 2001; 34: 165-71
 12. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease : identification of 19 novel mutations. *J Med Genet.* 1999; 36: 833-6
 13. DiDonato M et Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1360: 3-16
 14. Sasaki N, Hayashizaki Y, Muramatsu M, Matsuda Y, Ando Y, Kuramoto T, Serikawa T, Azuma T, Naito A, Agui T, et al. The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 202(1): 512-8
 15. Cox D. Genes of the copper pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 56:828-34
 16. Loudianos G, Lovicu M, Dessi V, Tzetis M, Kanavakis E, Zancan L, Zelante L, Galvez-Galvez C et Cao A. Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutations of ATP7B. *Hum Mutat* 2002; 20:260-6
 17. Harada M, Kawaguchi T, Kumemura H, Terada K, Ninomiya H, Taniguchi E, Hanada S, Baba S, Maeyama M, Koga H, Ueno T, Furuta K, Suganuma T, Sugiyama T et Sata M. The Wilson disease protein ATP7B resides in the late endosomes with Rab7 and the Niemann-Pick C1 protein. *Am J Pathol* 2005; 166(2): 499-510
 18. Cater MA, Forbes J, La Fontaine S, Cox D et Mercer JF. Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *Biochem J* 2004; 380(Pt 3): 805-13

19. Lutsenko S, Tsivkovskii R et Walker JM. Functional properties of the human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) and regulation by metallochaperone Atox1. *Ann N Y Acad Sci* 2003 A; 986: 204-11
20. Huster D, Hoppert M, Lutsenko S, Zinke J, Lehmann C, Mossner J, Berr F et Caca K. Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines. *Gastroenterology* 2003; 124(2): 335-45
21. Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F et Vonk RJ. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 2000; 119(3): 782-93
22. Harada M, Sakisaka S, Kawaguchi T, Kimura R, Taniguchi E, Koga H, Hanada S, Baba S, Furuta K, Kumashiro R, Sugiyama T et Sata M. Copper does not alter the intracellular distribution of ATP7B, a copper-transporting ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(3): 871-6
23. Forbes JR et Cox DW. Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* 2000; 9(13): 1927-35
24. Harada M, Sakisaka S, Terada K, Kimura R, Kawaguchi T, Koga H, Taniguchi E, Sasatomi K, Miura N, Sukanuma T, Fujita H, Furuta K, Tanikawa K, Sugiyama T et Sata M. Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2000; 118(5): 921-8
25. Schaefer M, Roelofsen H, Wolters H, Hofmann WJ, Muller M, Kuipers F, Stremmel W et Vonk RJ. Localization of the Wilson's disease protein in human liver. *Gastroenterology* 1999; 117(6): 1380-5
26. Suzuki M et Gitlin JD. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatr Int* 1999; 41(4): 436-42
27. Lutsenko S et Cooper MJ. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11): 6004-9

28. Chelley J et Monaco AP. Cloning the Wilson disease gene. *Nature Genetics* 1993; 5: 317-8
29. Mori M, Yoshida MC, Takeichi N et Taniguchi N. The LEC Rat : a new model for hepatitis and liver cancer. Springer-Verlag Tokyo, 1991
30. Miyoshi E, Fujii J, Hayashi N et Taniguchi N. LEC Rats : an overview of recent findings. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1997; 10: 135-45
31. Wu J, Forbes JR, Chen HS et Cox D. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genetics* 1994; 7: 541-5
32. Yamaguchi Y, Heiny M, Shimizu N, Aoki T et Gitlin J. Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans Cinnamon rat. *Biochem J* 1994; 301: 1-4
33. Polio J, Enriquez RE, Chow A, Wood WM et Atterbury C. Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11(2):220-4
34. Sone K, Maeda M, Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, Sugimura T et Nagao M. Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long Evans Cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride. *Hepatology* 1996; 23: 764-70
35. Cuthbert J. Wilson's disease: a new gene and an animal model for an old disease. *J Investig Med* 1995; 43(4): 323-36
36. Gitlin J. Wilson Disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 1868-77
37. Asonuma K, Inomata Y, Kasahara M, Uemoto S, Egawa H, Fujita S, Kiudhi T, Hayashi M et Tanaka K. Living related liver transplantation from heterozygote genetic carriers to children with Wilson's disease. *Pediatr Transplant* 1999; 3: 201-205
38. Wang XH, Cheng F, Zhang F, Li XC, Qian JM, Kong LB, Zhang H et Li GQ. Copper metabolism after living related liver transplantation for Wilson's disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2836-8

39. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y et Uchino J. Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis: a model of Wilson's disease. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1858-61
40. Schosinsky KH, Lehmann HP et Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem* 1974, 20 (12): 1556-63
41. Higgins G.M. et Anderson R.M. Experimental pathology of the liver. *Arch Path Lab Med* 1931, 12: 186-202
42. Berry MN et Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969, 43:506-20
43. Gottwald E, Müller O et Polten A. Semiquantitative reverse transcription- polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Electrophoresis* 2001; 22: 4016-22
44. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH et Ogawa K. Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long Evans Cinnamon Rats. *Gastroenterology* 1996, 111:1654-60
45. Irani AN, Mahli H, Slehria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky M et Gupta S. Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease. *Molecular Therapy* 2001; 3(3) : 302-309
46. Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schilsky ML et Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 438-47
47. Burlina AB. Hepatocyte transplantation for inborn errors of metabolism. *J. Inherit Metab Dis* 2004; 27:373-83
48. Li Y, Togashi Y et Takeichi N. Abnormal copper accumulation in the liver of LEC rats : a rat form of Wilson's disease. *The LEC rat. A new model for hepatitis and liver cancer.* Springer-Verlag Tokyo 1991, 122-140

49. Sakamoto H, Kamimura Y, Minase T, Yokoyama S, Satoh M et Mori M. Consecutive follow-up study of the liver of LEC rats before the onset of spontaneous hepatitis. . *The LEC rat. A new model for hepatitis and liver cancer*. Springer-Verlag Tokyo 1991, 95-102
50. Gupta S, Rajvanshi P, Bhargava K et Kerr A. Hepatocyte transplantation: progress toward liver repopulation. *Prog Liv Dis* 1996; 14: 199-222
51. Gupta S, Vasa SRG, Rajvanshi P, Zuckier L, Palestro CJ et Bhargava KK. Analysis of hepatocyte distribution and survival in vascular beds with cells marked by ^{99m}Tc or endogenous dipeptidyl peptidase IV activity. *Cell Transplantation* 1997; 6(4): 377-86
52. Rajvanshi P, Fabrega A, Bhargava KK, Kerr A, Pollak R, Blanchard J, Palestro CJ et Gupta S. Rapid clearance of transplanted hepatocytes from pulmonary capillaries in rats indicates a wide safety margin of liver repopulation and the potential of using surrogate albumin particles for safety analysis. *Journal of Hepatology* 1999; 30: 299-310
53. Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Saito T et Sakamoto S. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* 1979; 28(6): 499-505
54. Kusano M et Mito M. Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 1982; 82(4): 616-28
55. Darby H, Gupta S, Johnstone R, Selden C et Hodgson HJ. Observations on rat spleen reticulum during the development of syngeneic hepatocellular implants. *Br. J. Exp. Path* 1986; 67: 329-39
56. Mito M et Sawa M. Hepatocyte transplantation. Karger Landes Systems 1997 :34-65
57. Shafritz D. Rat liver stem cells : prospects for the future. *Hepatology* 2000; 32(6): 1399-400
58. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva M et Shafritz DA. Long-term, near-total liver

- replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153(1): 319-29
59. Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN, Petkov PM, Rosencrantz R, Sandhu JP, Moss SF, Wang S, Hurston E, Laconi E, Holt PR, Thung SN, Zhu L et Shafritz DA. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1999; 30: 903-13
60. Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R et Kay MA. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998; 28: 707-16
61. Jiang B, Masayuki S, Yamamoto T et Kasai S. Enhancement of proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in cirrhotic rats by hepatic stimulatory substance. *Transplantation* 1997; 63(1): 131-5
62. Adams RM, Wang M, Crane AM, Brown B, Darlington GJ et Ledley FD. Effective cryopreservation and long-term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation, and replicative potential. *Cell Transplantation* 1995; 4(6): 579-86
63. Baccarani U, Donini A, Sanna A, Risaliti A, Cariani A, Nardo B, Cavallari A, Martinelli G, Ridolfi L, Bellini G, Scalapogna M et Bresadola F. First report of cryopreserved human hepatocytes based bioartificial liver successfully used as a bridge to liver transplantation. *American Journal of Transplantation* 2003; 4: 286-9
64. van de Kerkhove MP, Hoekstra R, Chamuleau R et van Gulik TM. Clinical application of bioartificial liver support systems. *Annals of Surgery* 2004; 240(2) : 216-30
65. Demetriou AA, Brown RS, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Schultze Am Esch J, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z et Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Annals of Surgery* 2004; 239(5): 660-70

- 66.Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G et Rela M. One liver, three recipients: Segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77(10): 1614-6
- 67.Riordan SM et Williams R. Transplantation of primary and reversibly immortalized human liver cells and other gene therapies in acute liver failure and decompensated chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2000; 6(5): 636-42
- 68.Horslen S et Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004; 77(10): 1481-6
- 69.Najimi M et Sokal E. Update on liver cell transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39(4) : 311-9
- 70.Fox IJ et Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transpl* 2004; 4(suppl.6) : 7-13
- 71.Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ et Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genetics* 1994; 6: 335-41
- 72.Raper SE, Grossman M, Rader DJ, Thoene JG, Clark BJ, Kolansky DM, Muller DW, Wilson JM. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg* 1996; 223(2) 116-26
- 73.Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV et Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type 1 with hepatocyte transplantation. *NEJM* 1998; 338(20): 1422-6
- 74.Strom SC, Fischer RA, Rubinstein WS, Barringer RB, Charron M, Mieles L, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT et Reyes J. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997; 29(4): 2103-6
- 75.Strom SC, Chowdhury JR et Fox IJ. Hepatocyte transplantation for treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19:39-48
- 76.Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC et Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an

- infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111(6): 1262-7
77. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G et Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359(9316): 317-8
78. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Otte JB, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A et Soriano H. Hepatocyte transplantation in a 4-year old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76(4): 735-8
79. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Verma A, Heaton ND, Rela M et Mieli-Vergani G. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78(12): 12-4
80. Mito M, Kusano M, Ohnishi T, Saito T, Ebata H. Hepatocellular transplantation. *Gastroenterol Jpn* 1978; 13 : 480-90
81. Mito M et Kusano M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transpl* 1993; 2: 65-74
82. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM et Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63(4): 559-69
83. Vu MD, Qi S, Xu D, Wu J, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, Dumont L, Busque S, Daloz P et Chen H. Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997; 64(12): 1853-6
84. Jiao Z, Ohnishi T, Bando Y, Chone Y, Kitaura K, Uehara H, Sazuki Y, Nakamura T et Izumi K. Effects of D-galactosamine hydrochloride and partial hepatectomy on spontaneous hepatic injury and hepatocarcinogenesis in Long-Evans Cinnamon rats. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(5): 496-504
85. Otsuka T, Izumi K, Tokunga I, Gotohda I, Ipposhi K, Takiguchi Y, Kaneda S, Satake N, Ohnishi T, Tashiro S et Shimada H. Prevention of lethal hepatic injury in Long-Evans Cinnamon (LEC)

- rats by D-galactosamine hydrochloride. *The Journal of Medical Investigation* 2006; 53: 81-6
- 86.Oliver JR, Mara TW et Cherian MG. Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy. *Exp Biol Med* 2005; 230(1): 61-7
- 87.Cherian MG et Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med* 2006; 231(2): 138-44
- 88.Margeli AP, Theocharis SE, Yannacou NN, Spiliopoulou C et Koutselimis A. Metallothionein expression during liver regeneration after partial hepatectomy in cadmium-pretreated rats. *Arch Toxicol* 1994; 68(10): 637-42

ANNEXES

Solution de pré-perfusion (1,5 L)

- NaHCO₃ (Sigma, FW=84,01) : 0,525 g
- HEPES (Sigma, FW= 238,3) : 3,57 g
- EGTA (Sigma, FW= 380,4) : 0,288 g
- HBSS (10x) (GibcoBRL) : 150 mL

Solution de perfusion (1,5 L)

- NaHCO₃ (Sigma, FW=84,01) : 0,525 g
- HEPES (Sigma, FW= 238,3) : 3,57 g
- CaCl₂ 2 H₂O (Sigma, FW= 147) : 0,251 g = 1,14 mM
- HBSS (10x) (GibcoBRL) : 150 mL
- Collagénase type IV (Sigma) : 0,162 g = 0,03% (à ajouter le jour de la chirurgie, quantité pour 500 mL de perfusion)

Solution de suspension (1 L)

- HEPES (Sigma, FW= 238,3) : 7,608 g
- CaCl₂ 2 H₂O (Sigma, FW= 147) : 0,294 g = 2 mM
- HBSS (10x) (GibcoBRL) : 100 mL

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 7,4 et ont été filtrées avec une mèche de 0,22 µm (Millipore).

