

Université de Montréal

**Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans la pathogénèse de l'encéphalopathie hépatique
chronique**

**Par
Xiaoling YANG
Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales
option générale**

Décembre 2009

©, Xiaoling YANG, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans la pathogénèse de l'encéphalopathie hépatique
chronique**

Présenté par :
Xiaoling YANG

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....

Nathalie Grandvaux, Ph.D.

Président-rapporteur

.....

Christopher Rose, Ph.D.

Directeur de recherche

.....

Jean-François Giguère, Ph.D., MD., FRCSC

Membre du jury

.....

RÉSUMÉ

L'encéphalopathie hépatique (EH) est un syndrome neuropsychiatrique dû à une dysfonction hépatique où l'ammoniaque est un facteur central. Il a déjà été rapporté que l'intoxication aiguë d'ammoniaque induise le stress oxydatif/nitrosatif. La présente étude cible à évaluer le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans 2 modèles de l'EH chronique : (1) l'anastomose portocave (PCA) et (2) la ligature de la voie biliaire (BDL). Ces 2 modèles sont caractérisés par une hyperammoniémie et une augmentation d'ammoniaque centrale, cependant l'œdème cérébral est trouvé seulement chez les rats BDL. Des marqueurs du stress oxydatif/nitrosatif ont été évalués dans le plasma et cortex frontal. Un stress nitrosatif central a été observé chez les rats PCA; tandis qu'un stress oxydatif/nitrosatif systémique a été démontré seulement chez les rats BDL. Ces résultats suggèrent (1) que l'hyperammoniémie chronique n'induit pas le stress oxydatif/nitrosatif systémique et (2) qu'un synergisme existe entre l'ammoniaque et le stress oxydatif/nitrosatif, en association avec l'œdème cérébral.

Mots-clés : Encéphalopathie hépatique minimale (EHM); Hyperammoniémie; Anastomose portocave (*portacaval anastomosis* PCA); Ligature voie biliaire (*bile duct ligation* BDL); Stress oxydatif/nitrosatif; Œdème cérébral.

ABSTRACT

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric complication due to liver failure where ammonia is believed to be central in the pathogenesis. Acute ammonia intoxication has demonstrated to induce oxidative/nitrosative stress in both *in vivo* and *in vitro* models. The present study was aimed to assess the role of oxidative/nitrosative stress in 2 models of chronic liver failure/HE; 1. portacaval anastomosis (PCA) and 2. bile duct ligation (BDL). Both models are characterised with hyperammonemia and increased brain ammonia however cerebral edema is only found in BDL rats. Oxidative/nitrosative stress markers were evaluated in plasma and frontal cortex of both animal models. Central nitrosative stress was observed in PCA rats, but systemic oxidative/nitrosative stress was demonstrated only in BDL rats. The results of our study suggest i) chronic hyperammonemia does not induce oxidative stress and ii) a synergistic effect between ammonia and systemic oxidative/nitrosative stress is associated with cerebral edema.

Keywords: Minimal hepatic encephalopathy (MHE); Hyperammonemia; Portacaval anastomosis (PCA); Bile duct ligation (BDL); Oxidative/nitrosative stress; Cerebral edema.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION	1
1. Encéphalopathie hépatique	2
Vue d'ensemble de l'encéphalopathie hépatique	2
<i>Cerveau</i>	2
<i>Foie</i>	3
<i>Encéphalopathie hépatique (EH)</i>	4
<i>Cirrhose et EH</i>	5
<i>Mécanismes pathologiques</i>	7
<i>Traitement</i>	7
Classification et grades cliniques	8
Encéphalopathie hépatique minimale (EHM)	10
2. Modèles animaux de l'EHM	12
Encéphalopathie portosystémique	12
Cirrhose expérimentale	13
3. Pathophysiologie de l'encéphalopathie hépatique	15
Ammoniaque	15
<i>Physiologie de l'ammoniaque</i>	15
<i>Production de l'ammoniaque</i>	16
<i>Élimination de l'ammoniaque</i>	16
<i>Ammoniaque et l'EHM</i>	18

Œdème cérébral et le gonflement des astrocytes	18
Stress oxydatif/nitrosatif	21
<i>Stress oxydatif/nitrosatif dans le cerveau</i>	21
<i>Marqueurs du stress oxydatif/nitrosatif</i>	24
<i>ROS</i>	24
<i>Marqueurs de peroxydation de lipides</i>	25
<i>HNE</i>	26
<i>MDA</i>	27
<i>Carbonylation</i>	28
<i>Glutathionylation</i>	29
<i>S-nitrosylation du résidu cystéine</i>	32
Hyperammoniémie et stress oxydatif/nitrosatif dans l'EH	33
4. But du projet	35
MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
1. Modèles animaux	38
PCA	38
BDL.....	38
Prélèvements des échantillons.....	38
2. Mesures de l'ammoniaque, de la fonction du foie et de ROS	39
Ammoniaque	40
Enzymes de la fonction du foie	40
Quantification de ROS	40
3. Évaluation du stress oxydatif/nitrosatif	42
Préparation du tissu cérébral	42
Peroxydation de lipides	42
Détection de HNE, de glutathionylation et S-nitrosylation par immunobuvardage de type Western	43
Évaluation de groupes carbonyles dans les chaînes latérales de protéines	44
Analyse statistique	44

RÉSULTATS	45
1. Hyperammoniémie dans les rats avec PCA et BDL	46
Ammoniaque.....	46
<i>Dans le plasma</i>	46
<i>Dans le LCR</i>	46
Fonction hépatique	48
<i>AST et ALT</i>	48
2. Stress oxydatif/nitrosatif dans les rats avec PCA et BDL	49
<i>ROS</i>	49
<i>Dans le plasma</i>	49
<i>Dans le LCR</i>	49
Peroxydation de lipides.....	51
<i>Dérivés de HNE</i>	51
<i>Dans les protéines plasmatiques</i>	51
<i>Dans les protéines cérébrales</i>	51
<i>MDA</i>	54
<i>Dans le plasma</i>	54
<i>Dans les protéines cérébrales</i>	54
Carbonylation de protéines	56
<i>Dans les protéines plasmatiques</i>	56
<i>Dans les protéines cérébrales</i>	56
Glutathionylation de protéines	58
<i>Dans les protéines plasmatiques</i>	58
<i>Dans les protéines cérébrales</i>	58
S-nitrosylation de protéines	60
<i>Dans les protéines plasmatiques</i>	61
<i>Dans les protéines cérébrales</i>	61

DISCUSSION	64
1. Hyperammoniémie dans l'EHM.....	65
2. Stress oxydatif/nitrosatif dans l'EHM.....	66
Stress oxydatif dans l'EHM.....	66
<i>Peroxydation de lipides dans l'EHM.....</i>	<i>66</i>
<i>HNE dans l'EHM.....</i>	<i>66</i>
<i>MDA dans l'EHM.....</i>	<i>67</i>
<i>Carbonylation de protéines dans l'EHM.....</i>	<i>68</i>
<i>Glutathionylation de protéines dans l'EHM</i>	<i>69</i>
<i>ROS dans l'EHM</i>	<i>69</i>
Stress nitrosatif dans l'EHM.....	71
<i>S-nitrosylation de protéines dans l'EHM.....</i>	<i>71</i>
Différence du stress oxydatif/nitrosatif entre les rats avec PCA et les rats avec BDL .	72
<i>Absence du stress oxydatif systémique et central chez les rats avec PCA.....</i>	<i>72</i>
<i>Présence du stress nitrosatif central, et non systémique chez les rats avec PCA</i>	<i>73</i>
<i>Présence du stress oxydatif/nitrosatif systémique, et non central chez les rats avec BDL.....</i>	<i>75</i>
3. Relation entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif.....	76
Relation indirecte entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif.....	76
Insuffisance de l'hyperammoniémie modérée à induire le stress oxydatif/nitrosatif	77
Dépendance temporelle possible du stress oxydatif/nitrosatif.....	78
4. Relation entre l'œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif.....	79
Relation indirecte entre l'œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif	79
Le stress oxydatif/nitrosatif protège-t-il les rats contre l'œdème cérébral	80
5. Action synergique entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif	82
6. Perspectives.....	83
7. Résumé	85

RÉFÉRENCES.....	86
ANNEXE.....	XV
Article.....	XV

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Classification clinique de l'encéphalopathie hépatique	8
Tableau II	Grades cliniques de l'encéphalopathie hépatique	9
Tableau III	Indicateurs de la fonction hépatique	48
Tableau IV	Ammoniaque et le stress oxydatif/nitrosatif dans les deux modèles de l'EHM.....	77
Tableau V	Œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif dans les deux modèles de l'EHM.....	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie du cerveau	3
Figure 2. Anatomie du foie	4
Figure 3. Anastomose portosystémique extrahépatique.....	6
Figure 4. Dérivation portosystémique intrahépatique.....	6
Figure 5. Anastomose portocave (<i>portacaval anastomosis</i> PCA)	12
Figure 6. Ligature de voie biliaire (<i>Bile duct ligation</i> BDL).....	14
Figure 7. Métabolisme de l'ammoniaque.....	16
Figure 8. Cycle de l'urée.....	17
Figure 9. Œdème cérébral dans la cirrhose expérimentale.....	19
Figure 10. Astrocytes d'Alzheimer de type II.....	20
Figure 11. Oxydation de résidus d'acides aminés de protéines	23
Figure 12. Formation du complexe protéine-protéine par HNE	24
Figure 13. Formation de ROS	25
Figure 14. Formation des aldéhydes par dimérisation	26
Figure 15. Formation de MDA.....	27
Figure 16. Carbonylation des résidus d'acides aminés de protéines	29
Figure 17. Glutathionylation de protéines	31
Figure 18. Mécanismes de la glutathionylation de protéines	31
Figure 19. Mécanismes de la production de RNS	33

Figure 20. Buts du projet.....	36
Figure 21. Niveau de l'ammoniaque dans le plasma artériel (A) et le LCR (B) chez les rats avec PCA et BDL	47
Figure 22. Niveau de ROS dans le plasma artériel (A) et le LCR (B) chez les rats avec PCA et BDL.....	50
Figure 23. Immunobuvardage de dérivés de HNE dans les protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL	52
Figure 24. Immunobuvardage de dérivés de HNE dans les protéines du cortex frontal chez les rats avec PCA et BDL	53
Figure 25. Niveau de MDA dans le plasma artériel (A) et dans les protéines du cortex frontal (B) chez les rats avec PCA et BDL	55
Figure 26. Immunobuvardage de la carbonylation dans les chaînes latérales de protéines du plasma artériel (A) et du cortex frontal (B) chez les rats avec PCA et BDL	57
Figure 27. Immunobuvardage de la glutathionylation dans les protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL	59
Figure 28. Immunobuvardage de la glutathionylation de protéines du cortex frontal chez les rats avec PCA et BDL	60
Figure 29. Immunobuvardage de la S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL.....	62
Figure 30. Immunobuvardage de la S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines cérébrales chez les rats avec PCA et BDL	63
Figure 31. Barrière hémato-encéphalique chez les rats avec PCA.....	70
Figure 32. Différence entre ROS et RNS	74
Figure 33. Rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans l'œdème cérébral chez les rats avec PCA et BDL.....	81
Figure 34. Résumé de deux modèles de l'EHM.....	85

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

BDL : *Bile duct ligation*/Ligature de la voie biliaire

DCF : Dichlorofluorescéine

DCFDA : Diacétate de dichlorofluorescéine

DNPH : 2, 4-dinitrophénylhydrazine

EH : Encéphalopathie hépatique

EHM : Encéphalopathie hépatique minimale

GS : Glutamine synthétase

GSH : Glutathion

HNE : 4-hydroxy-2-nonéal

HO[•] : Radical hydroxyle

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MDA: Malondialdéhyde

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO : Oxyde nitrique

NOS : NO synthétase

O₂^{•-}: Anion superoxyde

PCA: *Portacaval anastomosis*/Anastomose portocave

RNS: *Reactive nitrogen species*/Espèces réactives de l'azote

ROS : *Reactive oxygen species*/Espèces réactives d'oxygène

SNC : Système nerveux central

SOD : Superoxyde dismutase

INTRODUCTION

1. Encéphalopathie hépatique

2. Modèles animaux de l'encéphalopathie hépatique minimale

3. Pathophysiologie de l'encéphalopathie hépatique

4. But du projet

1. ENCÉPHALOPATHIE HÉPATIQUE

Vue d'ensemble de l'encéphalopathie hépatique

La fonction normale du cerveau dépend de plusieurs aspects de la fonction hépatique. Le foie en santé produit des facteurs et des métabolites, et en même temps enlève des substances neurotoxiques telles l'ammoniaque, ce qui aide le cerveau à fonctionner normalement (Butterworth, 2003).

Le cerveau

Le cerveau est l'organe qui traite les informations provenant des sens, contrôlant de nombreuses fonctions du corps dont la motricité volontaire et constituant le siège des fonctions cognitives. Anatomiquement, les deux hémisphères du cerveau sont divisés en plusieurs lobes appelés frontal, temporal, pariétal et occipital (Figure 1). Le lobe frontal joue un rôle dans la motricité volontaire et la programmation motrice; dans les fonctions cognitives exécutives (les capacités de planification et d'organisation intellectuelle) et dans les différentes activités telles le langage (expression), la mémoire et le comportement. Le lobe temporal comprend les aires auditives, les aires du langage et les zones impliquées dans les processus cognitifs (la mémoire et l'émotion). Le lobe pariétal est le siège de la sensibilité et du langage et joue aussi un rôle dans la fonction visuospatiale. Le lobe occipital est le centre visuel (orientation et le contour des images). De plus, le cervelet et le tronc cérébral sont importants dans l'anatomie fonctionnelle du cerveau. Le cervelet est situé sous les 4 lobes du cerveau et est derrière le tronc cérébral. Le cervelet régule les activités musculaires du mouvement volontaire, de la posture et du maintien de l'équilibre. Le tronc cérébral est placé sous le cerveau et en avant du cervelet, cette partie joue un rôle clé dans la connexion des systèmes nerveux sensoriel et moteur, en étant le centre de passage de voies sensibles et motrices. Les neurones et

les cellules gliales (astrocytes, microglies et oligodendrocytes) composent principalement le cerveau.

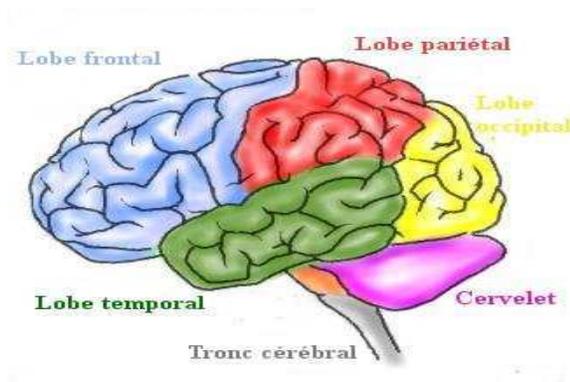


Figure 1. Anatomie du cerveau

Le lobe frontal (bleu); le lobe pariétal (rouge); le lobe temporal (vert) et le lobe occipital (jaune) sont situés sous le crâne. Le cervelet (mauve) et le tronc cérébral (gris) se positionnent sous le cerveau (image importée et modifiée de www.medical-illustrations.ca).

Le foie

Le foie est l'organe et la glande le plus volumineux chez l'humain (~1,5 kg). Cet organe joue un rôle majeur dans le métabolisme et a un nombre important de fonctions telles que le stockage de glycogène, la décomposition des globules rouges, la production des hormones et la désintoxication. Le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) qui ont de multiples fonctions incluant la production de la bile. Cette dernière est conservée entre les repas dans la vésicule biliaire. Après avoir mangé, la bile est sécrétée dans le duodénum afin d'aider à la digestion de lipides. Les échanges du foie avec le reste du corps se font pour la plupart à travers la veine porte et l'artère hépatique, qui se terminent par une multitude de capillaires à l'intérieur du foie (Figure 2).

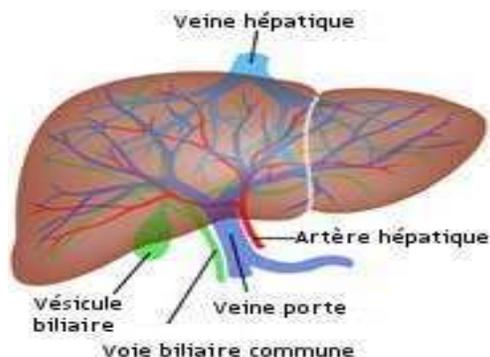


Figure 2. Anatomie du foie

Le foie est divisé en deux lobes dont le lobe droit (deux tiers du volume) et le lobe gauche (un tiers du volume). La vésicule biliaire est située sous le foie, où la bile est stockée. La veine porte amène le sang provenant de l'intestin vers le foie, tandis que l'artère hépatique provenant de l'aorte alimente le foie en sang oxygéné (image importée et modifiée de www.lomalindahealth.org).

Encéphalopathie hépatique (EH)

L'EH est une complication neuropsychiatrique survenant au cours de la maladie hépatique. C'est un syndrome caractérisé par des modifications cognitives, psychiatriques et motrices. Les patients ressentent des troubles du sommeil, des changements de la personnalité et une durée d'attention raccourcie. Ces symptômes sont suivis par des troubles psychiatriques comme l'anxiété et la dépression, ainsi que par des problèmes moteurs, une incoordination motrice et un type de tremblement des mains appelé astérisis. Avec la progression de la maladie, les patients ne répondent plus aux stimuli externes, ce qui conduit finalement au coma et à la mort (Butterworth, 2003).

L'EH présente deux formes majeures, l'EH due à une insuffisance hépatique fulminante, qui est caractérisée au niveau cérébral par le gonflement des astrocytes, l'œdème et l'hypertension intracrânienne. L'augmentation de la pression intracrânienne conduit ensuite à une herniation cérébrale et à la mort (Butterworth, 2002). L'insuffisance hépatique chronique telle la cirrhose est à l'origine principale de l'autre forme de l'EH, développant l'EH portosystémique, qui est due à une présence des collatérales naturelles ou de la dérivation portosystémique chirurgicale.

Cirrhose et EH

Ce syndrome neuropsychiatrique présente un mauvais pronostic et le taux de mortalité à un an s'élève à près de 60% (Dbouk and McGuire, 2006). L'EH est un syndrome observé surtout chez les patients atteints de cirrhose, soit dans près de 30-45% des cas (Poordad, 2007). La cirrhose est définie histologiquement par une forme avancée de fibrose hépatique progressive avec une distorsion de l'architecture hépatique et une formation de nodules de régénération (Lefton et al., 2009). En raison de la présence de cicatrices dans le foie, la cirrhose conduit à une obstruction de l'écoulement du sang et provoque par la suite une hypertension portale. Cette hypertension originant de la cirrhose entraîne parfois spontanément des collatérales portosystémiques et le sang de la veine porte est plutôt dévié vers la circulation systémique. Vu que l'hypertension portale est dangereuse, car elle conduit aux saignements intra-gastro-intestinaux, le traitement de cette hypertension est essentiel. L'hypertension portale est traitée soit par l'anastomose portocave (PCA) à l'extérieur du foie (Figure 3), soit par une déviation portosystémique intrahépatique (*transjugular intrahepatic portal-systemic stent shunts*, TIPS) (Figure 4). De nos jours, la PCA est moins utilisée et est graduellement remplacée par TIPS, qui s'effectue à l'aide d'un tuteur inséré à l'intérieur du foie reliant la veine porte et la veine hépatique. La création d'une déviation portosystémique afin de traiter l'hypertension portale induit cependant secondairement l'EH. Les substances provenant de la digestion de la nourriture dans l'intestin entrent normalement dans le foie par la veine porte et certaines substances toxiques telles l'ammoniaque sont ensuite métabolisées par le foie. Par contre, en présence d'une déviation de la veine porte vers les veines systémiques, ces substances toxiques entrent dans le sang par la dérivation portosystémique et ne sont pas détoxifiées par le foie. Ces substances de la circulation systémique arrivent ensuite au cerveau via la barrière hémato-encéphalique, même si cette dernière peut bloquer certaines neurotoxines afin de protéger le cerveau. En étant un gaz, l'ammoniaque diffuse librement par les membranes ainsi que par la barrière hémato-encéphalique. L'entrée de l'ammoniaque, neurotoxique, entraîne finalement le développement de l'EH (Butterworth, 2003).

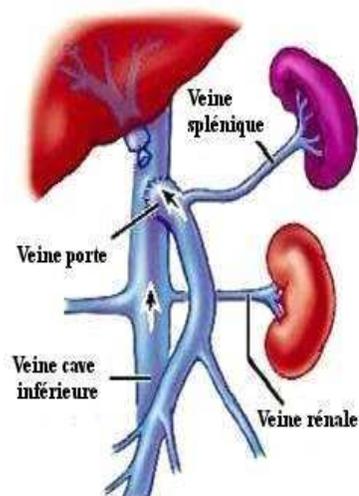


Figure 3. Anastomose portosystémique extrahépatique

L'anastomose portocave se réalise chirurgicalement par une connexion directe de la veine porte et la veine cave inférieure. La PCA est une ancienne chirurgie pour traiter l'hypertension portale (image importée et modifiée de www.medical-dictionary.thefreedictionary.com).

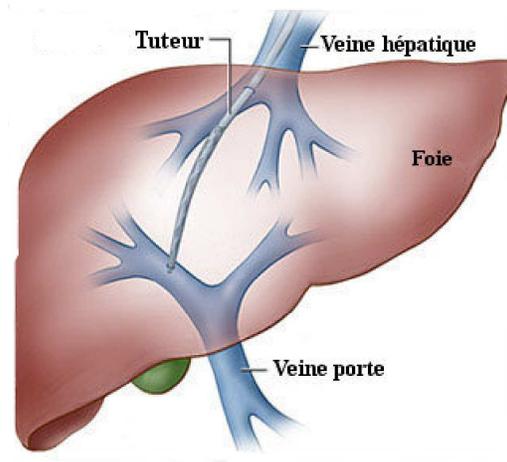


Figure 4. Dérivation portosystémique intrahépatique (*transjugular intrahepatic portal-systemic stent shunts, TIPS*)

Une anastomose s'effectue chirurgicalement par une liaison entre la veine porte et la veine hépatique avec un tuteur (image importée et modifiée de www.keepingyouwell.com).

Mécanismes pathologiques

La pathologie de l'EH est complexe et n'est pas complètement comprise, cependant l'ammoniaque est considérée comme un facteur majeur dans sa pathogénèse (Bosoi and Rose, 2009; Butterworth, 2002). Depuis la description de l'ammoniaque dans l'EH il y a 100 ans, plus de 1200 documents ont exploré son rôle et ont confirmé que l'ammoniaque est central dans l'EH (Shawcross and Jalan, 2005). Les mécanismes de la pathophysiologie de l'EH incluent aussi la neurotoxicité du manganèse (Rose et al., 1999), l'insuffisance du métabolisme énergétique (Astore and Boicelli, 2000; Lockwood et al., 1986), l'altération de la barrière hémato-encéphalique (Scorticati et al., 2004) et l'altération du système de neurotransmetteurs tels les systèmes du glutamate, de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de la sérotonine (Ahboucha and Butterworth, 2004; Bergeron et al., 1990; Monfort et al., 2002). De plus, il a été aussi découvert que l'anormalité des astrocytes (Butterworth, 2003) et l'œdème cérébral (Jover et al., 2006) avait une implication dans la pathogénèse de l'EH. Le stress oxydatif/nitrosatif a aussi été démontré dans l'EH (Norenberg et al., 2004).

Traitement

La transplantation du foie est la première option thérapeutique de l'EH (Arria et al., 1991) parce que l'EH est un syndrome métabolique réversible. À cause d'un manque de donneurs de foie, les traitements sont devenus importants pour que les patients survivent jusqu'à la disponibilité d'un foie. La thérapie de l'EH cible aussi la diminution de la concentration de l'ammoniaque. Par exemple, une approche est basée sur la diminution de la production de l'ammoniaque dans l'intestin. Le lactulose, un disaccharide non absorbable et un laxatif osmotique; tandis que la rifaximine, un antibiotique, sont proposés comme des médicaments efficaces dans l'EH ces dernières années (Pedretti et al., 1991; Prasad et al., 2007). Les antibiotiques diminuent le nombre de bactéries de l'intestin, réduisant la production de l'ammoniaque (Eroglu and Byrne, 2009). L'autre approche tentée afin d'augmenter la capacité de l'élimination de l'ammoniaque. Par exemple, les études cliniques et expérimentales ont permis de découvrir que l'ornithine-aspartate et l'ornithine-phénylacétate étaient capables de

diminuer le niveau de l'ammoniaque en augmentant l'activité de l'enzyme glutamine synthétase dans les muscles (Kircheis et al., 2002; Rose et al., 1999; Ytrebø et al., 2009).

Classification et grades cliniques

Au congrès mondial de gastro-entérologie de 1998 à Vienne, une classification de l'EH a été proposée. Selon cette classification, l'EH est subdivisée en types A, B et C (Ferenci et al., 2002).

Tableau I : Classification clinique de l'encéphalopathie hépatique

<u>Type A (<i>Acute</i>)</u>	décrit une encéphalopathie hépatique associée à l'insuffisance hépatique aiguë,
<u>Type B (<i>By-pass</i>)</u>	est causée par des anastomoses portosystémiques sans maladies associées avec le foie,
<u>Type C (<i>Cirrhosis</i>)</u>	chez les patients présentant une cirrhose.

Le classement des symptômes de l'EH est effectué conformément au système de classification de West Haven, se référant au niveau de l'atteinte de l'autonomie, des changements dans la conscience, de la fonction intellectuelle, du comportement et de la dépendance à la thérapie (Blei and Córdoba, 2001).

Tableau II : Grades cliniques de l'encéphalopathie hépatique

<u>Grade 0</u>	<i>Encéphalopathie hépatique minimale</i> Altération de la mémoire; la concentration; la fonction intellectuelle et la coordination; absence de changements détectables dans la personnalité ou le comportement. L'astérixis est absent.
<u>Grade 1</u>	Manque de sensibilisation; raccourcissement de la durée d'attention; troubles du sommeil; altération de l'humeur; ralentissement de la capacité à effectuer des tâches mentales. L'astérixis peut être détecté.
<u>Grade2</u>	Léthargie ou apathie; désorientation dans le temps; comportements inappropriés; troubles d'élocution; amnésie des événements récents; diminution de la capacité à accomplir des tâches mentales; changements de personnalité évidents. L'astérixis est présent.
<u>Grade 3</u>	Somnolence; confusion; désorientation dans le temps et le lieu; comportements bizarres; amnésie; incapacité à accomplir des tâches mentales; signe de Babinski positif.
<u>Grade 4</u>	Coma avec ou sans réponse à des stimuli douloureux.

En outre, la durée et les caractéristiques ont permis de classer l'EH en épisodique, récurrente, persistante et minimale (Stewart and Cerhan, 2005). L'EH épisodique signifie que ce syndrome est apparu spontanément ou a été précipité par des conditions cliniques potentiellement réversibles liées aux symptômes d'une maladie du

foie, tels des saignements gastro-intestinaux, une infection et des effets indésirables de la thérapie (déshydratation). L'EH récurrente est caractérisée par deux épisodes de l'EH spontanée ou précipitée en un an; tandis que l'EH persistante est caractérisée par un déficit cognitif chronique, qui affecte la qualité de la vie (Stewart and Cerhan, 2005). Le terme encéphalopathie hépatique minimale (EHM) définit les patients atteints de cirrhose, qui ne manifestent pas cliniquement les syndromes spécifiques de l'EH, mais qui présentent une déficience cognitive aux études neuropsychologiques et neurophysiologiques (Amodio et al., 2004).

Encéphalopathie hépatique minimale (EHM)

L'EHM est le grade 0 de l'EH, qui se nommait auparavant l'EH sous-clinique (Schomerus and Hamster, 1998). Torre Delgadillo et al. (2006) estimaient que la prévalence de l'EHM atteignait 84% chez les patients souffrant de cirrhose. La prévalence de l'EHM atteint 72% chez les patients présentant une dérivation spontanée et 35% chez les patients présentant une obstruction de la veine porte extrahépatique (Sharma et al., 2008). En outre, l'EHM est aussi observée chez les patients avec implantation de TIPS (Bahn et al., 2002; Bajaj et al., 2008).

Les deux premières études de l'EHM, Zeegen et al. (1970) et Rikkers et al. (1978) ont permis de découvrir l'altération de la performance psychométrique et l'anormalité neurophysiologique (électroencéphalographie, EEG) chez les patients atteints de cirrhose, mais qui ne présentaient pas de symptômes cliniques évidents de l'EH. L'EHM est la forme la plus bénigne de l'EH (Dhiman and Chawla, 2009), caractérisée par des changements subtils dans les fonctions cognitives, les paramètres électrophysiologiques et neuropsychologiques, l'homéostasie des neurotransmetteurs, le flux sanguin cérébral et le métabolisme cérébral (Amodio et al., 2004; Dhiman and Chawla, 2009).

Les patients de l'EHM manifestent un processus mental lent et une altération dans l'attention, la mémoire et la perception visuelle (Poordad, 2007). L'EHM est corrélée à la diminution de la qualité de la vie. De nombreux paramètres de la vie quotidienne, tels le sommeil, la mobilité (manger, marcher et travailler), l'interaction

sociale et la communication ont été montrés altérés chez la population de patients présentant l'EHM (Groeneweg et al., 1998). Une diminution de la capacité du travail et de l'apprentissage a été notée chez les patients affectés par l'EHM (Schomerus and Hamster, 2001). En plus, la réduction de la capacité de conduire a été observée chez les patients souffrant de l'EHM, suggérant que l'EHM soit un facteur important dans les accidents de voitures de ceux-ci (Bajaj, 2008). De plus, une étude plus récente a montré une augmentation (17%) d'accidents chez les patients avec cirrhose, diagnostiqués avec l'EHM, par rapport aux patients avec cirrhose sans l'EHM (Bajaj et al., 2009).

Le diagnostic de l'EHM est important parce que l'EHM présente une risque élevée de développer l'EH sévère qui est associée avec la mortalité accrue (Amodio et al., 2001; Saxena et al., 2001; Saxena et al., 2002). Cependant, vu le manque d'évidence de signes et de symptômes cliniques, l'EHM reste encore difficile à diagnostiquer. Bien que les critères diagnostiques de l'EHM ne soient pas normalisés, il est proposé de mesurer par des tests neurophysiologiques et neuropsychologiques la présence de l'EHM chez les patients cirrhotiques (Amodio et al., 2004; Kharbanda et al., 2003; Stewart and Smith, 2007). L'EHM est considérée comme positive en présence d'au moins deux paramètres anormaux dans les tests neurophysiologiques et/ou neuropsychologiques. Le niveau de l'ammoniaque est aussi un indicateur important dans le diagnostic de l'EHM (Sharma et al., 2008).

2. MODÈLES ANIMAUX DE L'EHM

Les modèles animaux employés dans les études de l'EHM sont l'anastomose portocave (*portacaval anastomosis*, PCA) et la ligature de voie biliaire (*bile duct ligation*, BDL) (Butterworth et al., 2009).

Encéphalopathie portosystémique

La PCA est un modèle largement utilisé pour induire l'EHM en effectuant une anastomose entre la veine porte et la veine cave inférieure (Butterworth et al., 2009) (Figure 5). La PCA est considérée comme un modèle équivalent à l'EHM chez les humains (Jover et al., 2005). Les animaux subissent l'intervention de PCA et développent l'encéphalopathie sur une période de quatre semaines.

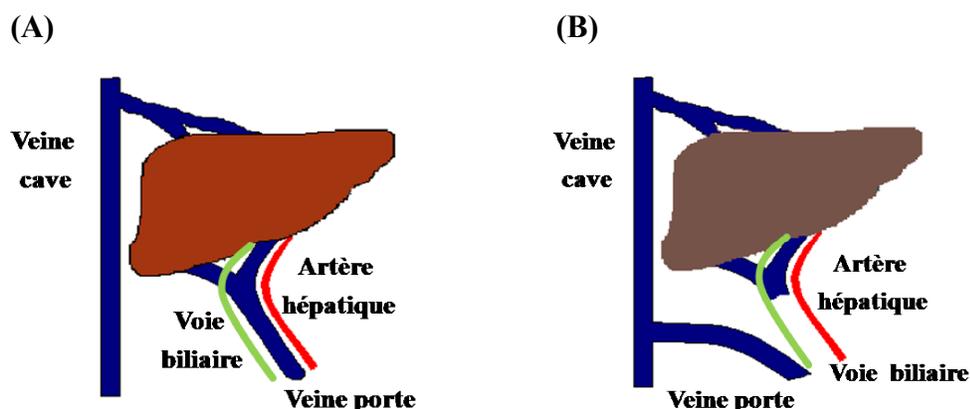


Figure 5. Anastomose portocave (*portacaval anastomosis* PCA)

(A) : Sous les conditions physiologiques, la veine porte draine le sang de l'intestin vers le foie où les toxines, incluant l'ammoniaque, sont éliminées. La veine porte offre un apport de 70% de sang au foie alors que 30% est complété par l'artère hépatique (rouge).
 (B) : Une anastomose portocave s'effectue par une déviation de la veine porte vers la veine cave inférieure. Le foie n'est alimenté que par l'artère hépatique.

Il a été constaté que les rats avec PCA avaient un affaiblissement moteur en étudiant leur activité ou leur comportement. Une altération ou un déficit de la performance locomotrice (manger, renifler, réponse aux stimuli et activité spontanée) a été démontré chez les rats avec PCA (Ahboucha et al., 2008; Bengtsson et al., 1986; Cauli et al., 2006; Oria et al., 2006; Theander et al., 1997). Aussi, une altération dans la capacité d'adaptation et d'apprentissage a été démontrée chez les rats avec PCA (Apelqvist et al., 1999; Erceg et al., 2005). La dysfonction cognitive (la mémoire spatiale et l'habituation comportementale) a aussi été observée (Monfort et al., 2007; Méndez et al., 2008; Sergeeva et al., 2005).

Les rats avec PCA manifestent une hyperammoniémie dans le sang et le cerveau (Schliess et al., 2002) et une difficulté à éliminer l'ammoniaque (Butterworth et al., 1988). Des modifications de la fonction de plusieurs neurotransmetteurs et une déficience énergétique ont été constatées chez les rats avec PCA (Apelqvist et al., 1998; Audet and Butterworth, 1998; Butterworth and Giguère, 1986; Butterworth et al., 1988; Giguère and Butterworth, 1984).

Cirrhose expérimentale

Contrairement au modèle de PCA, une hyperammoniémie sans altération des hépatocytes, le modèle de la cirrhose expérimentale est utilisé dans le but d'induire une insuffisance hépatique chronique (Butterworth et al., 2009). La cirrhose originant de l'obstruction de la voie biliaire (cirrhose biliaire secondaire) permet d'étudier l'EH associée à une dysfonction hépatique. Elle se réalise par une ligature de la voie biliaire commune (*bile duct ligation* BDL) (Rose et al., 1999) (Figure 6). Lorsque cette dernière est bloquée, la bile, qui est toxique s'accumule dans le foie, provoquant la mort des hépatocytes. L'EHM se développe pendant six semaines après la chirurgie de BDL chez les rats (Butterworth et al., 2009; Chan et al., 2004).

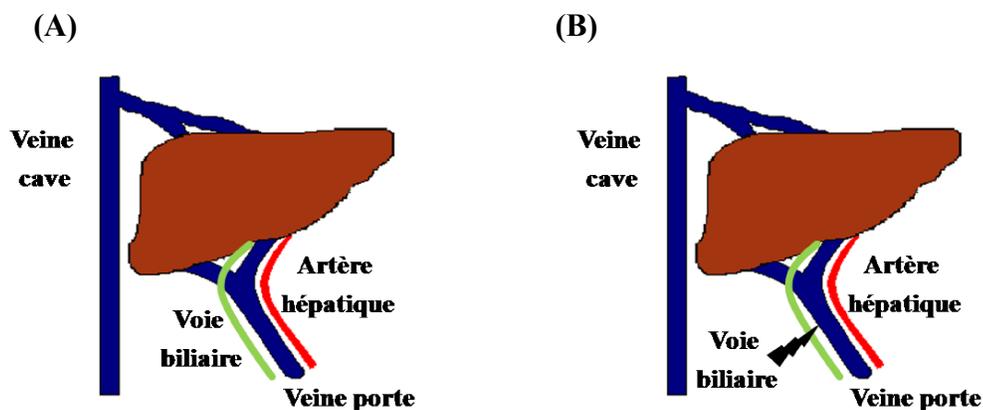


Figure 6. Ligature de la voie biliaire commune (*bile duct ligation* BDL)

(A) : La bile est produite et sécrétée par le foie vers l'intestin afin d'aider la digestion de la nourriture. (B) : Le modèle de BDL s'effectue par ligature de voie biliaire commune, l'EHD se développe pendant six semaines suivant l'intervention.

Une altération de la coordination motrice et un déficit dans la performance locomotrice ont été observés chez les rats avec BDL (Rodrigo et al., 2005; Dunn et al., 1991; Huang et al., 2009). Une dysfonction cognitive (mémoire spatiale) a aussi été démontrée chez les rats avec BDL (Huang et al., 2009).

Ce modèle est caractérisé par l'hypertension portale, les collatérales portosystémiques, l'ascite et la jaunisse (Jover et al., 2006; Kountouras et al., 1984).

3. PATHOPHYSIOLOGIE DE L'EH

La pathologie de l'EH est complexe et multifactorielle, or l'ammoniaque est considérée comme le facteur central dans la pathogénèse de l'EH (Bosoi and Rose, 2009; Butterworth, 2002). Des modifications dans le métabolisme énergétique, le système de neurotransmetteurs, le pH, le système de l'oxyde nitrique, le potentiel membranaire et les récepteurs de benzodiazépine de type périphérique ont aussi été décrites dans cette pathogénèse (Hazell and Butterworth, 1999). L'œdème cérébral et le gonflement des astrocytes ont aussi une implication dans ce syndrome neuropsychiatrique. Plus récemment, le stress oxydatif/nitrosatif a également été proposé d'être associé avec l'EH (Häussinger and Schliess, 2008).

Ammoniaque

Physiologie de l'ammoniaque

L'ammoniaque joue un rôle important dans la physiologie de l'organisme. Elle est produite par le métabolisme des acides aminés provenant de la nutrition (Wu, 2009). La maintenance d'un niveau faible de l'ammoniaque est nécessaire pour assurer une fonction normale de l'organisme. La concentration normale de l'ammoniaque dans le plasma artériel est 50-100 μM (Felipo and Butterworth, 2002) et elle est neurotoxique à des concentrations élevées (Romero-Gómez et al., 2009).

Dans les conditions normales, 98% de l'ammoniaque totale est présente sous forme ionique (NH_4^+) et 2% est sous forme gazeuse (NH_3). Cette distribution des deux formes dans l'organisme est due au ratio de $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$ ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$), défini par l'équation de Henderson-Hasselbach.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} (\text{NH}_3/\text{NH}_4^+)$$

(pKa de l'ammoniaque est 9,15 à 37°C (Bromberg et al., 1960))

L'ammoniaque est une base faible, mais elle peut agir comme un très faible acide. Bien que NH_3 , un gaz qui diffuse rapidement dans la membrane plasmique, alcalinise initialement les cellules, il est suivi par l'entrée du NH_4^+ via des transporteurs de K^+ , ce qui acidifie ensuite les cellules. L'ammoniaque possède des propriétés ioniques similaires au K^+ , ce qui permet au NH_4^+ d'utiliser les transporteurs de K^+ pour entrer dans les cellules. L'ammoniaque est donc un facteur important dans la modification du pH intracellulaire et extracellulaire (Bosoi and Rose, 2009).

Production de l'ammoniaque

L'ammoniaque est principalement produite dans l'intestin par la digestion des aliments. En outre, les bactéries dans l'intestin jouent aussi un rôle dans la production de l'ammoniaque. En plus, elle est générée par plusieurs réactions de déamination des acides aminés telles la glutaminase (Figure 7).

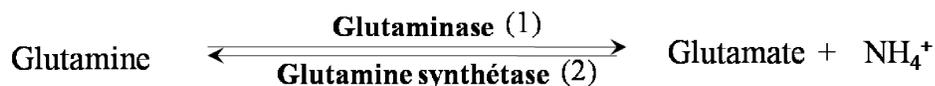


Figure 7. Métabolisme de l'ammoniaque

L'ammoniaque est générée par l'enzyme la glutaminase (1) dans l'intestin, les reins et le cerveau. L'ammoniaque est éliminée par l'enzyme glutamine synthétase (2) dans le foie, les muscles et le cerveau.

Élimination de l'ammoniaque

Le foie, par le cycle de l'urée, élimine 70% de l'ammoniaque. Le cycle de l'urée comprend cinq réactions : deux sont localisées dans la mitochondrie et trois dans le cytoplasme (Figure 8). Le cycle convertit deux groupes amine, dont l'un est le NH_4^+ et l'autre provient de l'aspartate, en urée, qui est éliminée par les reins. La synthèse de l'urée est effectuée dans les hépatocytes périportaux.

L'ammoniaque peut aussi être éliminée par la glutamine synthétase (GS), qui est située dans le foie, le muscle et le cerveau (Figure 7).

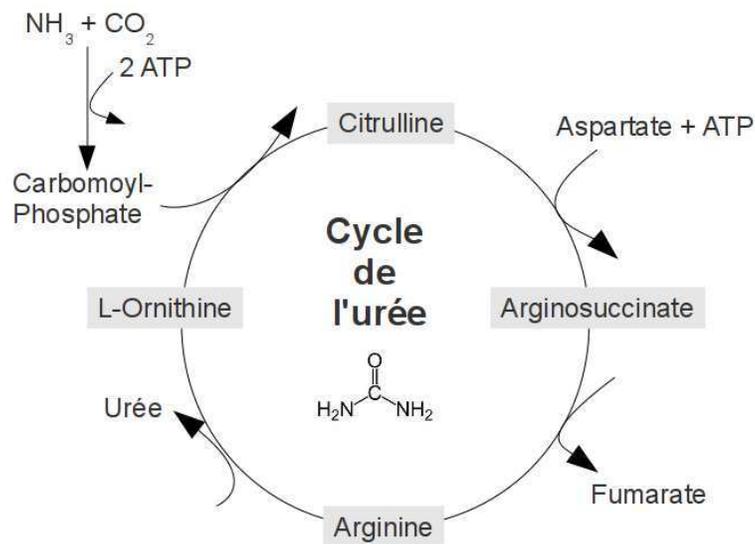


Figure 8. Cycle de l'urée

Le cycle de l'urée consiste en cinq réactions, qui produisent l'urée à partir de l'ammoniaque. Deux amines sont excrétées par ce cycle, l'une provient de la première réaction où l'ammoniaque est convertie en carbomoyl-phosphate. L'aspartate, fournissant l'autre amine, se joint au cycle et l'urée formée par les deux amines est ensuite excrétée par les reins.

Sous des conditions pathologiques telles la dysfonction hépatique, le cerveau et le muscle squelettique sont les deux organes essentiels pour éliminer l'ammoniaque (Desjardins et al., 1999; Lockwood et al., 1979). Étant donné que deux enzymes du cycle de l'urée sont absentes dans le cerveau, le mécanisme de l'élimination de l'ammoniaque cérébral dépend exclusivement de l'action de GS (Figure 7). Plus intéressant, GS existe uniquement dans les astrocytes où le glutamate est converti en glutamine, en prenant une molécule d'ammoniaque. Ce sont donc les astrocytes et non les neurones qui prennent la responsabilité de la détoxification de l'ammoniaque dans le système nerveux central (SNC) (Cooper and Plum, 1987). Le muscle squelettique, comptant pour 40% du poids total d'un homme sain (Lockwood et al., 1979), joue aussi un rôle important dans l'homéostasie de l'ammoniaque.

Ammoniaque et l'EHM

La pathogénèse de l'EHM est similaire à celle de l'EH sévère, ainsi l'ammoniaque joue un rôle important dans l'EHM (Dhiman and Chawla, 2009). Ong et al. (2003) ont découvert une corrélation entre le niveau d'ammoniaque et la sévérité d'EH. Chez les patients de l'EH de grade 1 ou 2, l'ammoniaque artérielle était généralement inférieure à 150 $\mu\text{mol/L}$, tandis que les patients de grade 3 présentaient une concentration moyenne de 150 $\mu\text{mol/L}$ et ceux de grade 4 présentaient une moyenne de 200 $\mu\text{mol/L}$.

Dans les études expérimentales de l'EHM telles PCA et BDL, une augmentation de la concentration de l'ammoniaque a aussi été observée dans le sang et dans le cerveau (Butterworth, 2002; Rodrigo et al., 2005). Les études de l'insuffisance hépatique chronique sur les animaux ont montré une augmentation de l'entrée d'ammoniaque dans le cerveau due à une perméabilité élevée de la barrière hémato-encéphalique à l'ammoniaque (Lockwood et al., 1991).

Œdème cérébral et le gonflement des astrocytes

L'œdème cérébral, causant l'augmentation de la pression intracrânienne est une caractéristique de l'EH aiguë. L'œdème cérébral est défini par une accumulation ou un excès d'eau dans le tissu intra- ou extracellulaire du cerveau, qui est la cause principale de la mort chez les patients de l'EH aiguë (Butterworth, 2002). La cavité crânienne est capable de tolérer un niveau modéré d'eau supplémentaire dans le tissu cérébral, sans qu'une élévation de la pression intracrânienne et l'herniation cérébrale ne se produise. Le mécanisme de l'œdème cérébral n'est pas défini, mais l'implication du gonflement des astrocytes a été proposée (Cordoba and Blei, 1996).

Dans le cas de l'EH induite par l'insuffisance hépatique chronique, les patients ne présentent pas une augmentation de la pression intracrânienne (Häussinger et al., 2000). Toutefois, des études récentes ont proposé qu'un œdème cérébral modéré soit présent chez les patients de l'EHM et que la perturbation de l'homéostasie du volume dans les

astrocytes soit un événement précoce dans la pathogénèse de l'EH associée avec la cirrhose (Lodi et al., 2004). En outre, nous avons aussi observé un œdème cérébral dans le modèle de BDL (Figure 9).

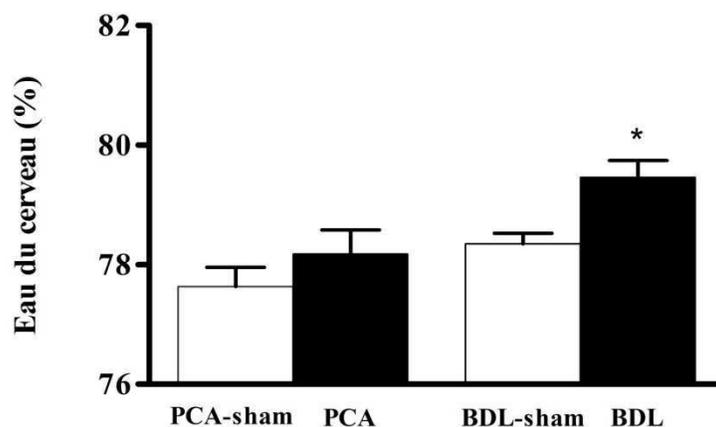


Figure 9. Œdème cérébral dans la cirrhose expérimentale

L'œdème cérébral a été observé dans le cortex frontal des rats de six semaines avec BDL (en noir) versus les rats contrôles (en blanc). Cependant, l'œdème cérébral n'a pas été noté dans les rats avec PCA. * $p < 0,05$ vs sham-contrôles.

Les patients de l'EH due à une insuffisance hépatique chronique manifestent plutôt une altération de la morphologie et de la fonction des astrocytes, qui sont connus sous le nom d'astrocytes d'Alzheimer de type II (Figure 10). Ces astrocytes présentent un gonflement du noyau, une proéminence du nucléole et une margination de la chromatine, qui ont été observés non seulement chez les patients, mais aussi chez les animaux expérimentaux de l'EH chronique (Butterworth, 2002).

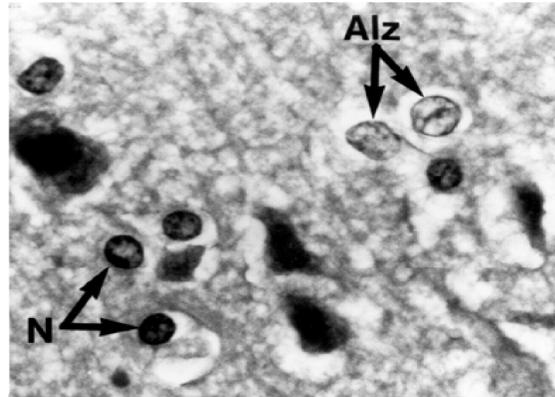


Figure 10. Astrocytes d'Alzheimer de type II

Les astrocytes provenant d'une patiente décédée de l'encéphalopathie hépatique (coma). L'image montre à la fois les astrocytes normaux (N), qui ont des noyaux foncés, et les astrocytes d'Alzheimer de type II qui sont caractérisés par les noyaux pâles et larges (Alz) (image importée et modifiée de Takahashi et al. (1991)).

Le mécanisme du gonflement des astrocytes n'est pas clair, mais le niveau élevé d'ammoniaque est proposé d'être la cause principale du gonflement des astrocytes. Ces derniers sont responsables de l'élimination de l'ammoniaque du cerveau. Le glutamate est converti en glutamine en prenant une molécule d'ammoniaque à l'aide de l'enzyme GS (Glutamate + NH_4^+ $\xrightarrow{\text{GS}}$ Glutamine). Ainsi, le niveau élevé d'ammoniaque accroît la production de la glutamine, ce qui provoque un gonflement osmotique des astrocytes (Norenberg et al., 1991). Dans les études *in vitro*, le gonflement des astrocytes a été observé lors d'une exposition à l'ammoniaque (Jayakumar et al., 2008; Warskulat et al., 2002).

Une association entre l'hyperammoniémie, l'œdème cérébral et le gonflement des astrocytes a été démontrée dans les études de l'EH due à une intoxication aiguë d'ammoniaque *in vitro* ou *in vivo* (Norenberg et al., 2007). Cependant l'œdème cérébral et le gonflement des astrocytes ne sont pas les seules conséquences de la neurotoxicité de l'ammoniaque. Il a été proposé que le stress oxydatif est aussi induit par l'hyperammoniémie (Häussinger and Schliess, 2008).

Stress oxydatif/nitrosatif

De plus en plus d'études supportent le fait que le stress oxydatif/nitrosatif soit impliqué dans la pathogénèse de ce syndrome neuropsychiatrique (Norenberg et al., 2004; Sathyaikumar et al., 2007).

Il y a 50 ans, la présence de radicaux libres dans le système biologique a été découverte (Commoner et al., 1954). Gerschman et al. (1954) ont proposé la formation de radicaux libres lors de la présence d'oxygène. Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments moléculaires contenant des électrons non-appariés dans des orbitales atomiques ou moléculaires (Valko et al., 2007). Un des groupes les plus importants de ces radicaux libres provient du métabolisme de l'oxygène, et s'appelle les espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS). Un autre groupe provient du métabolisme de l'azote, connu sous le nom d'espèces réactives de l'azote (*reactive nitrogen species*, RNS).

La formation de radicaux libres est un processus physiologique et certains jouent des rôles importants dans la signalisation moléculaire (Chen et al., 2008; Dawson and Snyder, 1994). Dans les conditions normales, ces radicaux libres sont enlevés par le système antioxydant afin de maintenir un équilibre entre les oxydants et les antioxydants. Le système antioxydant protège les cellules contre les attaques de ROS/RNS selon trois mécanismes : (1) enlever les ROS ou RNS; (2) lier aux ions métalliques nécessaires pour former les ROS et (3) réguler à la hausse les antioxydants (Poon et al., 2004). Cependant, au cours de la pathologie, cet équilibre est détruit, soit par une augmentation de radicaux libres dépassant la capacité de la défense antioxydante, soit par une altération du système antioxydant, créant une situation de stress oxydatif.

Stress oxydatif/nitrosatif dans le cerveau

Le stress oxydatif a été découvert dans plusieurs maladies neurologiques telles la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson et la

maladie de Huntington (Brown and Robberecht, 2001; Massaad et al., 2009; Sorolla et al., 2008; Yao et al., 2004) .

En raison de sa quantité élevée en acides gras insaturés, de sa consommation d'oxygène élevée (20 % d'oxygène total du corps) et du niveau relativement faible du système antioxydant, le cerveau est susceptible d'être attaqué par les ROS/RNS (Poon et al., 2004). Le système antioxydant du cerveau inclut les antioxydants enzymatiques et certaines molécules de défense, qui sont capables d'enlever les ROS/RNS formés physiologiquement. Les enzymes antioxydantes comprennent principalement la Cu/Zn-superoxyde dismutase (SOD), la Mn-SOD, la glutathion peroxydase et la catalase. D'autres mécanismes de défense englobent le glutathion, l'acide ascorbique, la vitamine E et un certain nombre de flavonoïdes alimentaires (Schulz et al., 2000).

Le stress oxydatif/nitrosatif décrit un état dans lequel les défenses antioxydantes cellulaires sont insuffisantes pour maintenir le niveau de ROS/RNS au-dessous d'un seuil de toxicité. La conséquence la plus directe du stress oxydatif/nitrosatif en réagissant avec les radicaux libres est l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides. Le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) réagit avec les bases (purines et pyrimidines) et le squelette de désoxyriboses de l'ADN, ce qui induit une lésion de l'ADN, par exemple, via une formation de 8-OH-G due aux ROS (Görg et al., 2008; Halliwell and Aruoma, 1991). Dans le cas des protéines, les chaînes latérales et dorsales de polypeptides sont les deux locations les plus ciblées par les radicaux libres, conduisant à l'oxydation de résidus d'acides aminés, à la génération d'un complexe protéine-protéine et à la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Stadtman, 2006) (Figures 11, 12). Ces modifications structurales et fonctionnelles des protéines, induites par le stress oxydatif/nitrosatif, conduisent par conséquent à une diminution de l'activité ou à l'inactivation des enzymes (Poon et al., 2004). Par exemple, l'inactivation de GS due à l'oxydation directe par des radicaux libres a été montrée (Aksenov et al., 1997). Quant à l'oxydation de lipides, vu que les acides gras insaturés possèdent de nombreuses double liaisons ($\text{RCH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CHR}$), ils sont plus susceptibles à l'attaque par les radicaux libres. Par exemple, la peroxydation des acides gras polyinsaturés génère les aldéhydes, 4-hydroxy-2-nonéal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA), qui réagissent par la suite avec les résidus

d'acides aminés des protéines pour former un complexe protéine-protéine (Figure 12). Étant donné que ces dérivés oxydatifs provenant de lipides sont des produits finaux et plus stables que les radicaux libres, ils fournissent des informations fiables afin de déterminer si le stress oxydatif est induit (Poon et al., 2004).

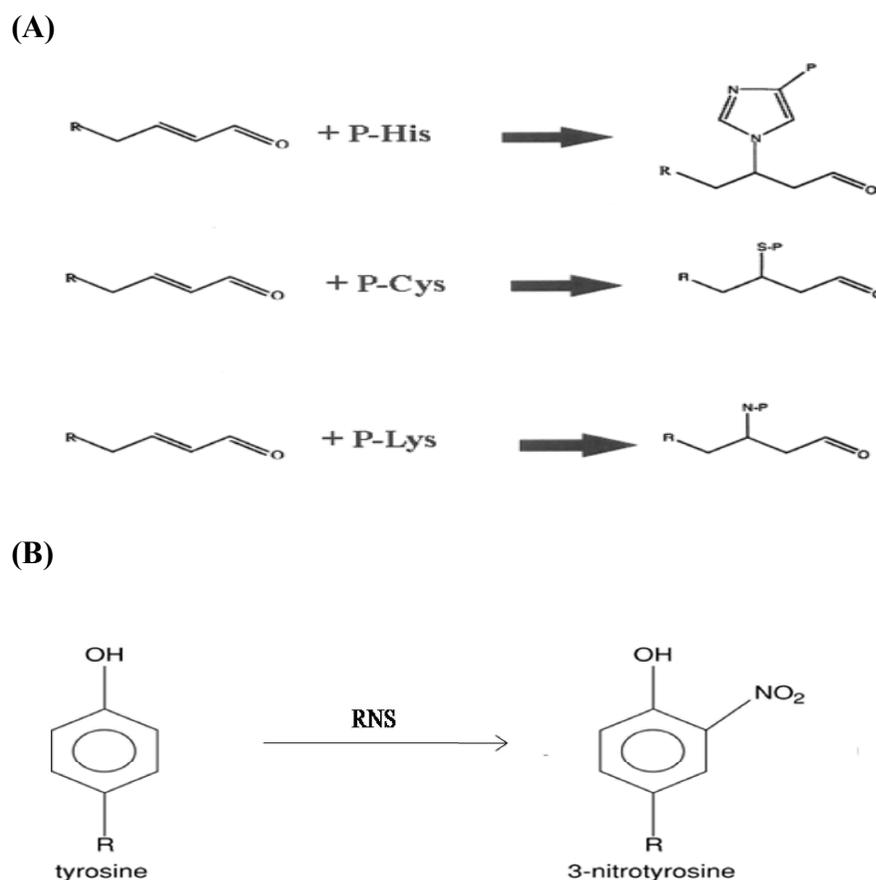


Figure 11. Oxydation de résidus d'acides aminés de protéines

(A) : La modification oxydée de protéines s'effectue par l'oxydation de résidus de l'histidine (His), la cystéine (Cys) et la lysine (Lys) dans la chaîne latérale de protéines (P) (Poon et al., 2004). (B) : La tyrosine est oxydée par les RNS, ce qui permet d'introduire un NO₂ à la tyrosine (nitrotyrosine) (image importée et modifiée de Yan (2009)).

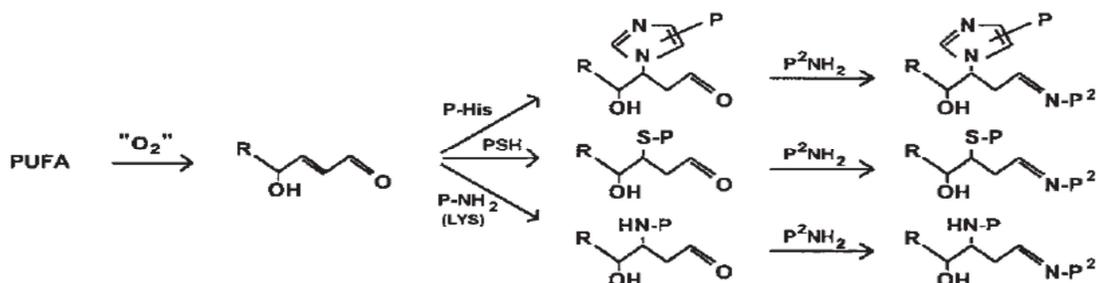


Figure 12. Formation du complexe protéine-protéine par HNE

Les acides gras polyinsaturés (*polyunsaturated fatty acids* PUFA) sont peroxydés en produisant un aldéhyde, qui réagit avec la 1^{ère} protéine (P). La 2^e protéine (P²) lie ensuite HNE pour former un complexe protéine-protéine (image importée et modifiée de Stadtman (2006)).

Marqueurs du stress oxydatif/nitrosatif

ROS

Les ROS majeurs incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) (Nordberg and Arnér, 2001). Les ROS sont les dérivés radicaux de l'oxygène, par exemple $O_2^{\bullet-}$ est généré principalement dans la mitochondrie où l'oxygène n'est pas complètement réduit par la chaîne respiratoire (Figure 13). $O_2^{\bullet-}$ possède une forte réactivité, qui est considéré comme ROS « primaire » et il réagit ensuite avec d'autres molécules pour former les ROS secondaires (Valko et al., 2007). Étant donné que $O_2^{\bullet-}$ est un anion, il requiert des transporteurs pour pénétrer les membranes mitochondriales tandis que H_2O_2 , l'autre membre important des ROS, est capable de traverser les membranes (Nordberg and Arnér, 2001).

H_2O_2 est produit lorsque les cellules détoxifient $O_2^{\bullet-}$ par la Cu/Zn-SOD dans le cytosol ou par la Mn-SOD dans la mitochondrie (Poon et al., 2004). H_2O_2 n'est pas un radical libre. Cependant, vu qu'il peut diffuser à travers les membranes et former les autres ROS intracellulaires, H_2O_2 est également considéré comme un membre des ROS (Valko et al., 2007). Normalement, H_2O_2 est éliminé par les enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase). Cependant, il est toxique pour les cellules lors de son

accumulation intracellulaire due à une diminution de l'activité d'antioxydants (Poon et al., 2004).

Un des rôles du H_2O_2 est la formation de HO^\bullet via la catalyse des ions métalliques ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$), qui se nomme « réaction de Fenton ». HO^\bullet est proposé d'être le radical libre le plus toxique en raison de sa forte réactivité et de sa modification irréversible dans les protéines, les lipides et l'ADN (Poon et al., 2004).

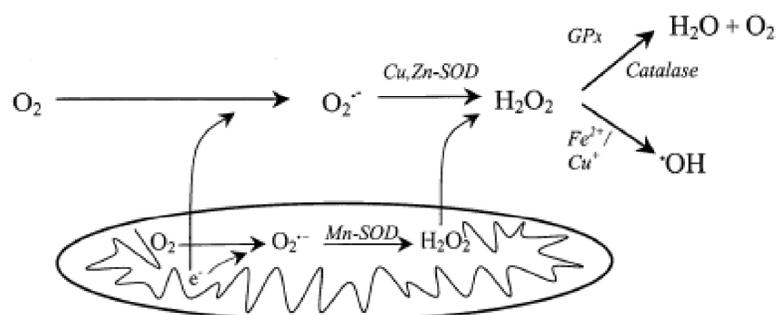


Figure 13. Formation de ROS

L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^\bullet) sont les composants plus communs des ROS. $\text{O}_2^{\bullet -}$ est produit principalement dans la mitochondrie, ce qui permet de former d'autres ROS, par exemple, H_2O_2 (par la Mn-SOD dans la mitochondrie ou par la Cu/Zn-SOD dans le cytosol). Ce dernier est un médiateur qui génère HO^\bullet par la catalyse des ions métalliques (Fe^{2+} ou Cu^+) ou qui forme de l'eau par la catalase ou le glutathion peroxydase (GPx) (image importée et modifiée de Nordberg and Arnér (2001)).

Marqueurs de peroxydation de lipides

À la suite de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, les hydroperoxydes d'acide gras relativement instables sont transformés en aldéhydes plus stables tels 2-hexenal, 2-octénal, 2,4-nonadienal et 4,5-dihydroxydecenal. Le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) sont les deux aldéhydes les plus étudiés, car ils sont les produits finaux et stables de l'oxydation de lipides.

HNE

HNE est le produit de la peroxydation des acides gras insaturés et consiste en trois groupes réactifs dont un aldéhyde, une double liaison carbone et un groupe hydroxyle. La formation des aldéhydes s'effectue par plusieurs mécanismes dont la dimérisation (Figure 14).

HNE est considéré comme un produit toxique de la peroxydation lipidique. Il réagit avec les protéines en formant les complexes protéine-protéine, ce qui induit une inactivation de protéines (Stadtman and Levine, 2003). De plus, il peut lier aux récepteurs et aux molécules de signalisation, modifiant ensuite la fonction de ces protéines (Van der Vliet and Bast, 1992). Une augmentation de HNE a été observée dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (Andersen, 2004; Zarkovic, 2003; Odetti et al., 2000).

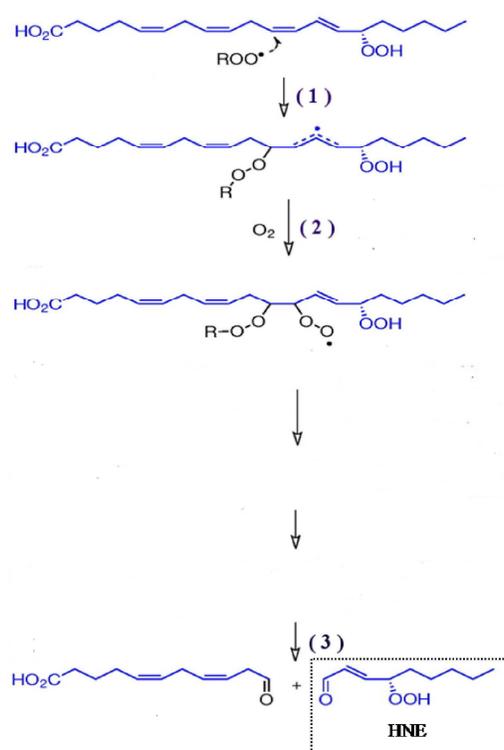


Figure 14. Formation des aldéhydes par la dimérisation

La formation des aldéhydes commence par (1) un groupe de radical peroxyde (ROO^\bullet) additionné à une chaîne des acides gras insaturés. L'oxydation d'un radical allyle permet de former le deuxième groupe peroxyde induisant un dimère de peroxyde (2). Le clivage de ce dimère de peroxydes (3) permet de former deux aldéhydes dont un est le HNE (image importée et modifiée de Schneider et al. (2008)).

MDA

Le MDA est un autre aldéhyde majeur et le plus étudié pour les effets de la peroxydation de lipides (Del Rio et al., 2005). Il est le produit de la décomposition lors de l'oxydation des acides gras insaturés (Figure 15). Le MDA peut être mesuré soit par sa concentration dans le plasma soit par ses dérivés dans les protéines ou dans l'ADN (Lykkesfeldt, 2007). L'augmentation du niveau MDA reflète une oxydation de lipides croissante et les modifications des composants des cellules. Le MDA réagit avec les bases de l'ADN, induisant des mutations dans les cellules de mammifères (Ji et al., 1998). Le MDA peut aussi lier aux résidus des acides aminés de protéines pour former un complexe protéine-protéine (Poon et al., 2004).

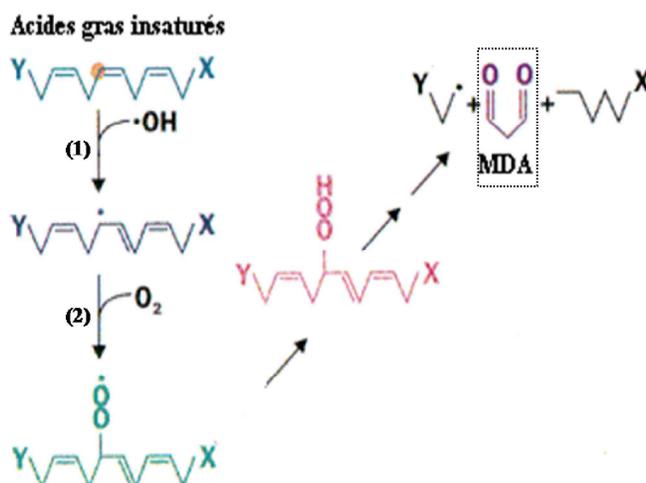


Figure 15. Formation de MDA

La peroxydation des acides gras insaturés s'effectue par deux oxydations consécutives dans la chaîne d'acides gras (réactions 1 et 2). Ceci permet de former une molécule de MDA (mauve) (image importée et modifiée de www.rndsystems.com).

Carbonylation

La carbonylation de protéines est un dommage oxydatif irréversible, conduisant souvent à une perte de la fonction des protéines. Cette modification de protéines est considérée comme un indicateur du dommage oxydatif sévère et de la dysfonction de protéines et est associée aux maladies (Dalle-Donne et al., 2006). Ces dérivés carbonylés de protéines sont des produits directs de la réaction de ROS/RNS avec les protéines, mais ils peuvent être secondairement formés par les réactions avec leurs produits protéiques primaires ou les sucres (Stadtman and Levine, 2003). Les groupes carbonyles peuvent être introduits par plusieurs voies. Les ROS réagissent directement avec les résidus d'acides aminés de protéines, par exemple les résidus lysine, arginine, proline et thréonine. Le semialdéhyde glutamique, un produit d'oxydation de l'arginine et de la proline, et le semialdéhyde aminoadipique, un produit d'oxydation de la lysine sont les deux produits principaux de l'oxydation de protéines catalysée par les métaux (Figure 16). Ces réactions directes sont les voies principales dans la formation de protéines carbonylées (Requena et al., 2001).

La carbonylation a été proposée comme un signal assurant que les protéines endommagées entrent dans la voie de dégradation plutôt que dans la voie de réparation. En effet, la modification carbonylée de protéines est un processus irréversible et les cellules ne sont pas capables de réparer ces modifications (Nyström, 2005). Étant donné que l'introduction de groupes carbonyles aux protéines altère la conformation des chaînes peptidiques, cela rend ces protéines inactives (Dalle-Donne et al., 2006).

Il est proposé que la carbonylation de protéines soit un événement précoce et qu'elle joue un rôle dans la progression de la maladie. Les protéines carbonylées modérément conduisent à la dégradation de protéines par le protéasome, tandis que les agrégats protéiques dus à la carbonylation provoquent l'inactivation de protéines (Dalle-Donne et al., 2006).

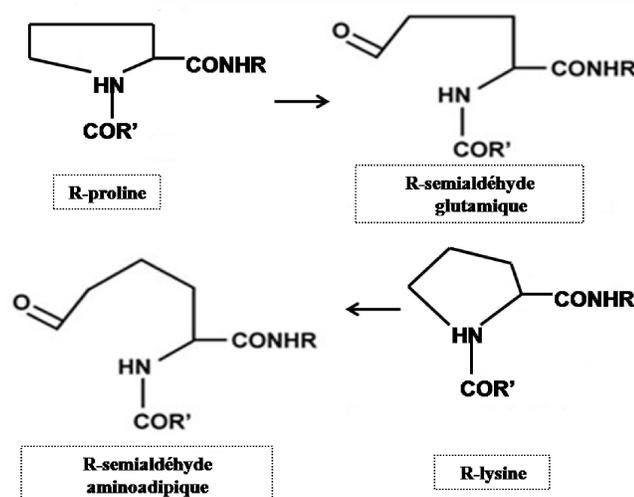


Figure 16. Carbonylation des résidus d'acides aminés des protéines

Les produits de l'oxydation directe du résidu (R) de certains acides aminés sont démontrés. Le semialdéhyde glutamique est le produit de la proline; le semialdéhyde aminoadipique est le produit de l'oxydation de la lysine (image importée et modifiée de Dalle-Donne et al. (2006)).

Glutathionylation (GSH)

Le glutathion est un tripeptide composé du glutamate, de cystéine et de glycine. Le glutathion est caractérisé par son effet antioxydant contre les ROS/RNS (Pompella et al., 2003), ce qui permet de maintenir l'équilibre redox des thiols, particulièrement dans le SNC (Aoyama et al., 2008). La fonction antitoxique de GSH est réalisée par la réaction de conjugaison médiée par les glutathion-S-transférases et la famille des GSH-peroxydases, où GSH joue le rôle de cofacteur. Le système de peroxydase de GSH est le mécanisme de défense le plus important contre H_2O_2 et d'autres peroxydes (hydroperoxyde lipidique). La forme oxydée de GSH, le GSSG, est un biomarqueur dans la mesure du stress oxydatif.

La glutathionylation est la formation d'un pont disulfure entre le résidu cystéine du GSH et une cystéine présente dans une protéine (Figure 17). Plusieurs mécanismes sont proposés afin d'expliquer la production de la glutathionylation de protéines

(Figure 18). Ce processus est un changement physiologique et réversible qui régule la balance du thiol et du redox. Cependant, l'augmentation de la glutathionylation de protéines est déjà considérée comme un biomarqueur de maladies associées avec le stress oxydatif (Giustarini et al., 2004; Nobili et al., 2005). Cette modification post-traductionnelle affecte la fonction de protéines, par exemple les protéines impliquées dans le cancer, l'apoptose et la capacité de la liaison à l'ADN (Pompella et al., 2003; Townsend et al., 2009).

La modulation de l'état du résidu cystéine sur les enzymes, les récepteurs, les transporteurs et les facteurs de transcription est reconnue comme un mécanisme important de la transduction du signal et une conséquence important du stress oxydatif. Certaines études ont rapporté qu'une inactivation des protéines induite par la glutathionylation, tandis que d'autres ont au contraire démontré que la glutathionylation provoque une activation d'enzymes telles que le complexe II de la mitochondrie (Chen et al., 2007; Mielal et al., 2008), l'enzyme responsable de la production de $O_2^{\cdot-}$. Ceci indique que les ROS/RNS pourraient servir de message secondaire en modifiant le statut de glutathionylation de protéines, résultat de diverses stimulations pathologiques.

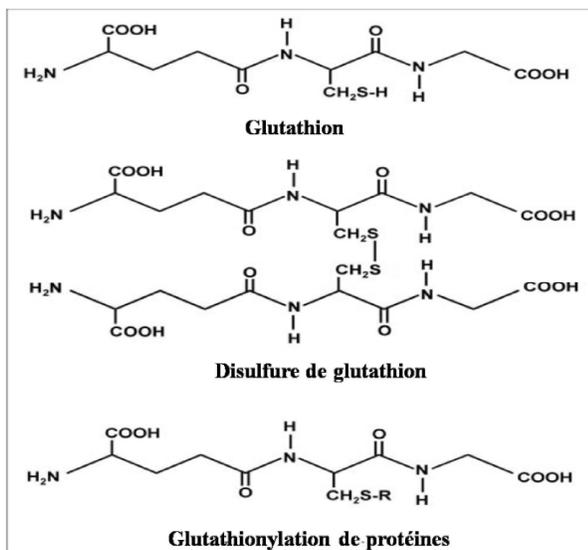


Figure 17. Glutathionylation de protéines

La formation d'un pont disulfure entre le résidu cystéine dans deux GSH. Ainsi, la glutathionylation de protéines est produite par une formation d'un pont disulfure entre le résidu cystéine du GSH et celui d'une protéine (image importée et modifiée de Dalle-Donne et al. (2006)).

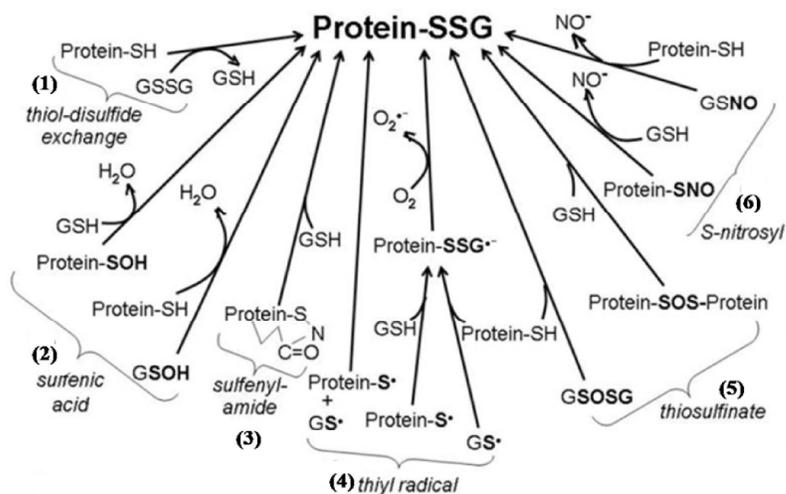


Figure 18. Mécanismes de la glutathionylation de protéines

Les mécanismes potentiels de la glutathionylation de protéines se font via l'échange thiol avec le disulfure (1); via l'acide sulfénique (2); via l'amide sulfényl (3); via le radical thiyl (4), via le thiosulfinate (5) et via le radical S-nitrosyl (6) (image importée et modifiée de Mieyal et al. (2008)).

S-nitrosylation du résidu cystéine

L'oxyde nitrique (NO) est produit par les NO synthétases (NOS). Le NO réagit avec $O_2^{\cdot-}$ pour former le peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$), qui produit secondairement d'autres RNS tel $^{\cdot}NO_2$ (Figure 19). Il existe trois formes de NOS dans le cerveau dont la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). En général, tous les neurones expriment nNOS, mais certains neurones expriment aussi iNOS (Moro et al., 1998). Les trois NOS sont exprimées par les astrocytes (Kugler and Drenckhahn, 1996; Murphy et al., 1993).

NO et $ONOO^{\cdot}$ endommagent la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Stewart and Heales, 2003). Pacher et al. (2007) ont démontré que le NO induit la mort neuronale et est impliqué dans la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les maladies de Parkinson et de Huntington.

Les RNS modifient également les protéines, les lipides et l'ADN, conduisant à une dysfonction de ces composants cellulaires (Yeo et al., 2008). La nitration du résidu tyrosine et la S-nitrosylation du résidu cystéine sont les deux modifications principales des protéines par les RNS sous conditions pathologiques. La nitration de protéines induit un repliement erroné de protéine, ce qui forme des agrégats protéiques et une dysfonction de ces protéines (Nakamura and Lipton, 2009). La modification à la hausse ou à la baisse du S-nitrosothiol, permet de prédire une altération cellulaire (Foster et al., 2003).

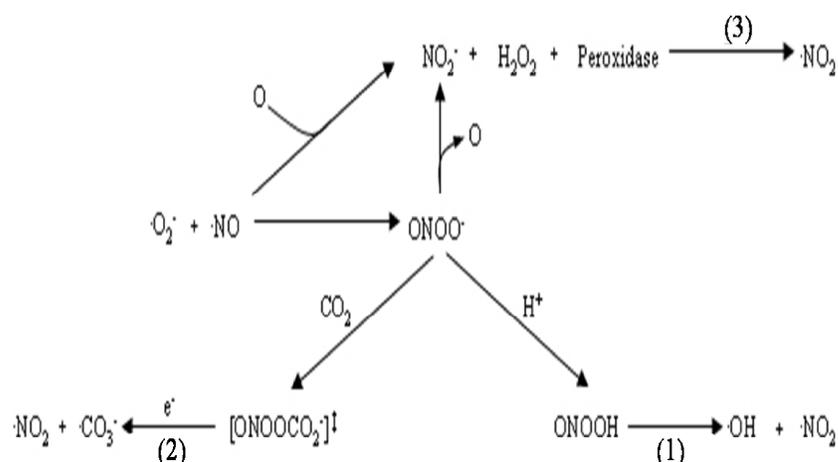


Figure 19. Mécanismes de la production de RNS

Le peroxylnitrite ($ONOO^{\cdot}$) est formé par la réaction du NO avec $O_2^{\cdot -}$. $ONOO^{\cdot}$ peut être réduit par la peroxydase en $ONOOH$, qui se décompose en $\cdot NO_2$ (1). Ce dernier peut être généré par d'autres réactions (2 et 3). Les autres RNS (NO_2^{\cdot}) et ROS ($\cdot OH$) sont aussi formés au cours de ces réactions (image importée et modifiée de Yeo et al. (2008)).

La S-nitrosylation du résidu cystéine est un mécanisme primordial afin de maintenir l'équilibre du redox, signifiant qu'un rapport sain entre les oxydants et les réducteurs. Cependant, des études récentes suggèrent que ce processus est important dans la survie neuronale et contribue de manière substantielle au développement de divers troubles neurodégénératifs (Chung, 2006-2007). De plus, l'attaque de protéines par les RNS a été décrite dans plusieurs maladies neurologiques (Pacher et al., 2007).

Hyperammoniémie et stress oxydatif/nitrosatif dans l'EH

Le mécanisme moléculaire de la neurotoxicité de l'ammoniaque n'est pas défini, or plusieurs mécanismes ont été proposés dont le stress oxydatif/nitrosatif (Norenberg et al., 2004).

Les études *in vitro* ont montré une induction de stress oxydatif dans les astrocytes traités avec 5 mM d'ammoniaque (Norenberg et al., 2007; Warskulat et al., 2002). Dans les modèles animaux avec insuffisance hépatique aiguë, un stress oxydatif induit par l'ammoniaque a également été observé (Reddy et al., 2004; Sathyaikumar et al., 2007). L'intoxication aiguë à des concentrations élevées d'ammoniaque, 12 mmol/kg (intrapéritonéalement) ou 60 mM (intrastrialement) chez le rat a été montré comme générant des radicaux libres (Hilgier et al., 2003; Kosenko et al., 2003).

L'oxyde nitrique (NO) est aussi un composant de radicaux libres impliqués dans l'EH. Dans les études *in vitro*, Schliess et al. (2002) ont montré une expression de NOS inductible dans les astrocytes exposés à 5 mM d'ammoniaque. Dans le cas des études avec les animaux, une élévation de l'activité et de l'expression de NOS a été constatée dans les modèles de PCA (Rao et al., 1995; Rao et al., 1997; Suárez et al., 2009). De plus, l'inhibiteur de NOS a permis une atténuation de la neurotoxicité de l'ammoniaque (Kosenko et al., 1995). Les modifications de protéines dues à RNS, par exemple, un niveau élevé de la nitrotyrosine de protéines cérébrales ont été observées chez les rats avec PCA (Schliess et al., 2002; Suárez et al., 2009).

En résumé, l'hyperammoniémie associée au stress oxydatif/nitrosatif a été observée dans les études de l'EH aiguë, soit dans les modèles animaux de l'insuffisance hépatique aiguë, soit dans les astrocytes primaires exposés à une concentration élevée (5 mM) d'ammoniaque. Cependant le stress oxydatif/nitrosatif induit par l'hyperammoniémie modérée dans l'EH chronique ou minimale n'est pas défini.

4. BUT DU PROJET

Il est connu que l'hyperammoniémie est impliquée dans l'EH et que la toxicité aiguë de l'ammoniaque (*in vivo* et *in vitro*) induit le stress oxydatif/nitrosatif. Toutefois, comme la relation entre l'hyperammoniémie chronique et le stress oxydatif/nitrosatif est inconnue, un but de ce projet est d'évaluer si l'hyperammoniémie chronique *in vivo*, induit le stress oxydatif/nitrosatif. Pour répondre à cette question, deux modèles de l'EH chronique/minimale ont été choisis (A) le BDL, (type C [Cirrhose]), caractérisé par la cirrhose de foie, l'hyperammoniémie, l'hypertension portale, les collatérales portosystémiques, l'ascite et la jaunisse et (B) le PCA, (type B [By-pass]), sans cirrhose du foie mais caractérisé par une dérivation portosystémique de 100% du sang et par une hyperammoniémie. Comme il est suggéré que la cirrhose du foie puisse induire le stress oxydatif (Sokol et al., 2006), ces deux modèles permettront d'identifier le rôle de l'ammoniaque, que ce soit en présence ou en absence de cirrhose hépatique. Étant donné que l'ammoniaque est élevée dans le sang et le cerveau, le stress oxydatif/nitrosatif sera aussi évalué dans le sang et le cerveau.

En outre, récemment notre laboratoire a découvert la présence d'œdème cérébral chez les rats avec BDL, un résultat qui n'a pas été trouvé chez les rats avec PCA. Ces résultats nous suggèrent que des facteurs autres que l'ammoniaque soient impliqués dans l'œdème cérébral. Ainsi, un autre but de ce projet est de déterminer la présence du stress oxydatif/nitrosatif systémique et central dans les 2 modèles de l'EHM. Comme le PCA et le BDL sont tous deux hyperammoniémiques mais que seul le BDL présente l'œdème, cela nous permettra d'éclaircir la relation entre l'ammoniaque, le stress oxydatif et l'œdème cérébral (Figure 20).

En utilisant plusieurs marqueurs de stress oxydatif/nitrosatif, nous avons mesuré les modifications oxydatives des protéines dans le plasma artériel et le cortex frontal des rats avec ces deux modèles. En plus, la quantité de ROS dans le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) a été mesurée.

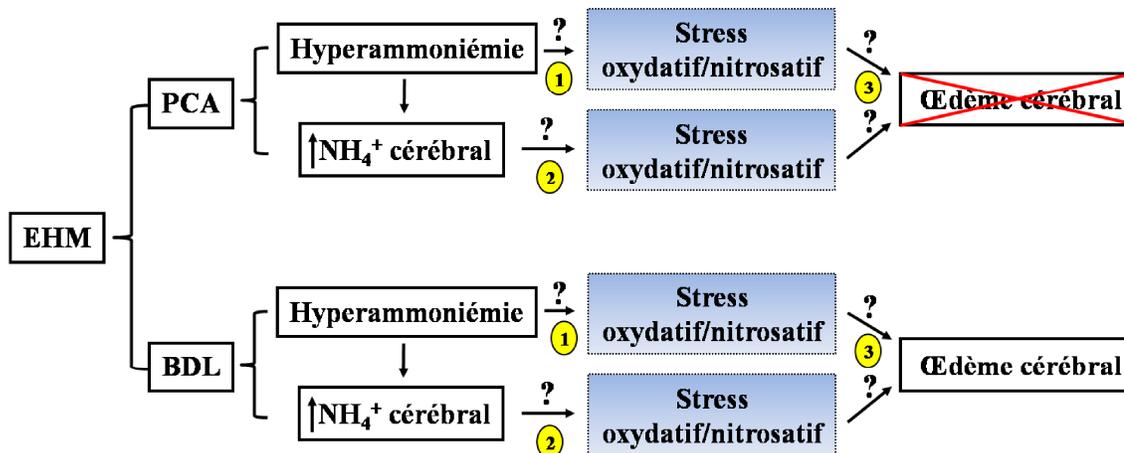


Figure 20. Buts du projet

En utilisant 2 modèles animaux d'hyperammonémie chronique et l'EHM, les buts du projet sont :

1. Évaluer la relation entre l'hyperammonémie et le stress oxydatif/nitrosatif systémique
2. Évaluer la relation entre l'augmentation d'ammoniaque dans le cerveau et le stress oxydatif/nitrosatif central
3. Déterminer le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans la pathogénèse de l'œdème cérébral

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Modèles animaux

2. Mesure de l'ammoniaque, la fonction du foie et ROS

3. Évaluation du stress oxydatif/nitrosatif

1. MODÈLES ANIMAUX

PCA

Les rats mâles Sprague-Dawley (250-275 g) ont subi une PCA (type B de l'EH) selon Lee and Fisher (1961). La laparotomie a été effectuée, et les veines porte et cave inférieure ont été isolées. Une ligature et un découpage de la veine porte ont été réalisés, tandis que la veine cave inférieure a été pincée et qu'une portion elliptique de 1,5 fois la taille de la veine porte a été enlevée. La PCA a été effectuée sous microscope en moins de 15 min. Des rats de même sexe et âge ont subi une opération PCA-sham où la veine porte et la veine cave inférieure ont été bloquées pendant 15 min sans réaliser la PCA. Tous les rats ont été sacrifiés par décapitation quatre semaines après l'intervention.

BDL

Le modèle de BDL a été effectué par la ligature de la voie biliaire, un modèle de type C (cirrhose) de l'EH. Les rats mâles Sprague-Dawley (250-275 g) ont été utilisés pour induire la cirrhose. La voie biliaire commune a été ligaturée par ligation double. Avant la ligature, la formaline (1 µl/mg) a été injectée dans le cholédoque afin d'empêcher la dilatation de la voie biliaire ligaturée. Le groupe contrôle se composait de cinq rats de même sexe et de même âge subissant une opération BDL-sham, réalisée par isolation de la voie biliaire commune, sans injection de la formaline, ni la ligature (Rose et al., 1999). Ces rats ont été sacrifiés six semaines après l'intervention.

Prélèvement des échantillons

Le LCR a été prélevé par un cathéter dans la *cisterna magna*. Les rats ont été anesthésiés avec l'isoflurane et le crâne a été isolé dans un appareil de stéréotaxie. Une incision a été effectuée à l'arrière du crâne et l'os occipital a été exposé. Un ciment dentaire a été utilisé pour faire un trou sur la ligne médiane sagittale rostrale à la suture interpariétale-occipitale. Un cathéter (tubes PE 10) a été inséré dans la grande citerne à travers la dure-mère. Un tube de silastic a été attaché au cathéter et à une aiguille 22G ½ reliée à une seringue. Le LCR a été prélevé et congelé immédiatement dans l'isopentane à -80°C.

Le plasma artériel et le cerveau ont par la suite été collectés et conservés immédiatement à -80°C.

Les expériences ont été menées en suivant les directives du Conseil Canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du centre de recherche du CRCHUM.

2. MESURE DE L'AMMONIAQUE, DE LA FONCTION HÉPATIQUE ET DE ROS

Ammoniaque

La concentration de l'ammoniaque a été mesurée dans le plasma et le LCR en utilisant une trousse commerciale (Sigma, St. Louis, MO). L'évaluation de la concentration de l'ammoniaque est basée sur une réaction avec l' α -cétoglutarate et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) réduit en présence du glutamate déshydrogénase. La concentration d'ammoniaque est fonction de l'oxydation du NADPH et le taux de cette oxydation a été enregistré par une diminution de l'absorbance à 340 nm.

Enzymes de la fonction du foie

Le plasma collecté a été envoyé au département de biochimie afin de mesurer les indicateurs de la fonction du foie, les aminotransférases de l'alanine (ALT) et de l'aspartate (AST).

Quantification de ROS

L'oxydation du diacétate de dichlorofluorescéine (DCFDA; Invitrogen, Carlsbad, CA) en dichlorofluorescéine (DCF) a été utilisée pour quantifier le niveau de ROS (majoritairement pour l'hydroxyle et le peroxydite). Le DCFDA est chimiquement oxydé en DCF, qui est non-fluorescente. En présence de ROS, la DCF devient fluorescente et la fluorescence émise est directement proportionnelle à la concentration de ROS.

Le DCFDA (100 μ M) a été incubé pendant 30 min avec le chlorhydrate d'hydroxylamine (40 mM) dans l'obscurité afin de former la DCF. Après l'incubation de

DCF avec le plasma artériel et le LCR, la variation de la fluorescence (Biotek, Winooski, USA) a été enregistrée pendant 10 min aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 520 nm.

3. ÉVALUATION DU STRESS OXYDATIF/NITROSATIF

Préparation du tissu cérébral

Le cortex frontal a été homogénéisé (PCA ou BDL ou leurs sham-contrôles respectifs) dans un tampon froid (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1/500 d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase, [Sigma]). Les homogénats ont été centrifugés pendant 40 min à 13,000g à 4°C. La concentration de protéines du surnageant cytosolique a été déterminée selon la méthode de Lowry et al. (1951).

Peroxydation de lipides

MDA, un marqueur de la peroxydation lipidique a été mesuré dans le plasma artériel par le *TBARS Assay Kit* (Cayman chemical Company, Ann Harbor, USA) ou dans les protéines du cortex frontal par le *LPO-586TM assay kit* (Oxis International, Beverly Hills, USA).

Le dosage des TBARS est basé sur la réaction du MDA avec l'agent chromogène, l'acide thiobarbiturique (TBA), sous conditions de haute température et d'acidité. Le complexe MDA-TBA formé a été mesuré par colorimétrie. Les échantillons du plasma ou du standard ont été ajoutés à la solution de TBA, d'acide acétique et d'hydroxyde de sodium. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 1 h à 100°C. Après l'incubation, les échantillons ou les standards ont été refroidis sur la glace pendant 10 min afin d'arrêter la réaction, puis ont été centrifugés pendant 10 min à 1600g à 4°C. Les échantillons ou les standards ont reposés durant 30 min à la température de la pièce avant que l'absorbance du surnageant soit mesurée à 532 nm.

La trousse LPO-586 est basée sur la réaction d'un réactif chromogène, le N-méthyl-2-phénylindole (NMPI) avec le MDA. Brièvement, après avoir isolé le cortex frontal du cerveau des rats (8 mg), l'homogénat du tissu a été préparé dans du tampon Tris froid (20 mM, pH 7.4), additionné de butylhydroxytoluène dans l'acétonitrile

(0,5 M) afin de prévenir l'oxydation des échantillons lors de l'homogénéisation. Les homogénats ont été centrifugés à 3000g à 4°C pour 10 min et la concentration des protéines cytosoliques (surnageant) a été quantifiée par la méthode de Lowry et al. (1951). La solution de N-méthyl-2-phénylindole a été ajoutée dans l'échantillon, suivi de l'addition d'acide chlorhydrique (12 N). La réaction a été effectuée à 45°C pendant 1 h, les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15,000g pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 586 nm. La courbe standard de MDA a été établie en utilisant le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane.

Détection de HNE, de glutathionylation et de S-nitrosylation par immunobuvardage de type Western

Les échantillons contenant 75 µg de protéines cytosoliques du cortex frontal ou 50 µg de protéines plasmatiques ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (8%) en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), puis transférés aux membranes de difluorure de polyvinylidène (PVDF) à 25 Volts pendant 16 h à 4°C. Ensuite, les sites non-spécifiques des membranes ont été bloqués avec 5% de lait écrémé dans du tampon de TBS-T (1 mM Tris, 10 mM NaCl et 0,5% de Tween-20) pendant 1 h à la température ambiante. Par la suite, les membranes ont été incubées durant 16 h à 4°C avec les anticorps primaires, anti-HNE (1:500, polyclonal de chèvre, Academy Bio-Medical, Houston, USA) pour les protéines plasmatiques; anti-HNE (pour les protéines cérébrales) (1:1000, polyclonal de lapin, Calbiochem, San Diego, USA); l'anti-glutathion (1:1000, monoclonal de souris, Vitrogen, Watertown, USA) et l'anti-S-nitrosylation du résidu cystéine (1:4000, anti-sérum de lapin, Sigma, Saint Louis, USA), tous dilués dans la solution de blocage. Après 3 lavages de 5 min avec du tampon TBS-T, les membranes ont été incubées avec le tampon du blocage contenant les anticorps secondaires correspondants, couplés à la peroxydase (HRP) pendant 1 h à une dilution de 1:10,000 (IgG, anti-lapin, Biosource, Camarillo, USA ; IgG, anti-souris, Perkin, Boston, USA). À la fin de l'incubation, les membranes ont été lavées 3 fois avec

du tampon TBS-T pendant 5 min chaque fois. La détection de l'immunoréactivité a été effectuée par incubation avec le substrat de chimioluminescence (GE Healthcare, Piscataway, USA) et une exposition sur des films à rayons-X (UXR, Dorval, Canada). Le dosage de β -actine (1:200,000, monoclonal de souris, Sigma) provenant de mêmes échantillons de lysats cérébraux a été utilisé comme contrôle de normalisation des protéines cérébrales.

Évaluation de groupes carbonyles dans les chaînes latérales de protéines

Le groupe carbonyle dans les chaînes latérales de protéines a été évalué par une trousse commerciale (Oxy Blot™ Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, USA). Les échantillons de protéines plasmatiques ou du cortex frontal (20 μ g) ont été mélangés avec 12% SDS. La dérivation a été réalisée par l'ajout de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pendant 15 min. Les réactions ont été arrêtées par l'ajout d'une solution de neutralisation. Les dérivés de DNP de protéines ont ensuite été séparés par SDS-PAGE, et suivi de l'immunobuvardage de type Western en utilisant l'anti-DNP (1:300) et l'anti-IgG de lapin couplé à HRP (1:300).

Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type à la moyenne (S.E.M.). L'importance de la différence a été évaluée avec le test de *Student* en utilisant *GraphPad Prism 4* (La Jolla, CA). Les valeurs de probabilité $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

RÉSULTATS

- 1. Hyperammoniémie dans les rats avec PCA et BDL*
- 2. Stress oxydatif/nitrosatif dans les rats avec PCA et BDL*

1. HYPERAMMONIÉMIE DANS LES RATS AVEC PCA ET BDL

Ammoniaque

L'hyperammonémie est un facteur central dans la pathogénèse de l'EH (Butterworth et al., 2009). L'hyperammonémie, l'augmentation anormale du niveau de l'ammoniaque dans le sang, induit par conséquent un accroissement de l'ammoniaque dans le cerveau (Lockwood, 2004). Les modèles animaux d'insuffisance hépatique aiguë présentent une hyperammonémie élevée, avec une concentration de 1,5 mM et 710 μ M dans le plasma et le cerveau respectivement (Reddy et al., 2004; Sathyaikumar et al., 2007). La concentration de l'ammoniaque a été mesurée dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR) dans la présente étude afin de déterminer la présence de l'hyperammonémie et du niveau d'ammoniaque dans le cerveau chez les deux modèles de l'EH chronique, les rats de quatre semaines avec PCA représentant le type B de l'EH et les rats de six semaines avec BDL représentant le type C (cirrhose) de l'EH.

Une trousse commerciale a permis la réalisation de la mesure d'ammoniaque dans le plasma et le LCR. La Figure 21 montre le niveau de l'ammoniaque dans le plasma et le LCR chez les rats avec PCA et BDL.

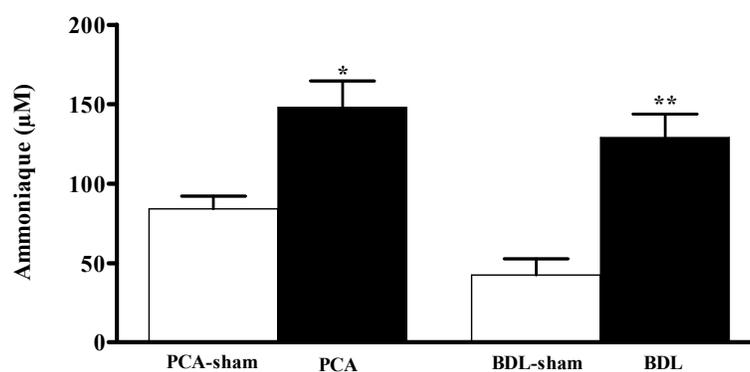
Dans le plasma

La concentration d'ammoniaque plasmatique était significativement plus élevée (1,7 fois) dans les rats avec PCA que dans les rats avec PCA sham-contrôles ($142,3 \mu\text{M} \pm 12,0$ vs $83,7 \mu\text{M} \pm 5,4$ respectivement, $p < 0,05$). Dans les rats avec BDL, une concentration élevée d'ammoniaque a été notée dans le plasma artériel (3,0 fois) par rapport aux rats avec BDL sham-contrôles ($129,1 \mu\text{M} \pm 14,8$ vs $42,5 \mu\text{M} \pm 9,9$ respectivement, $p < 0,01$).

Dans le LCR

Dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), l'ammoniaque était significativement augmentée (6,1 fois) dans les rats avec PCA versus les rats avec PCA sham-contrôles ($135,1 \mu\text{M} \pm 22,9$ vs $22,0 \mu\text{M} \pm 8,2$ respectivement, $p < 0,01$). L'ammoniaque du LCR s'élevait de 5,2 fois dans les rats avec BDL comparativement aux rats avec BDL sham-contrôles ($147,4 \mu\text{M} \pm 38,3$ vs $27,9 \mu\text{M} \pm 4,5$ respectivement, $p < 0,05$).

(A) Plasma



(B) LCR

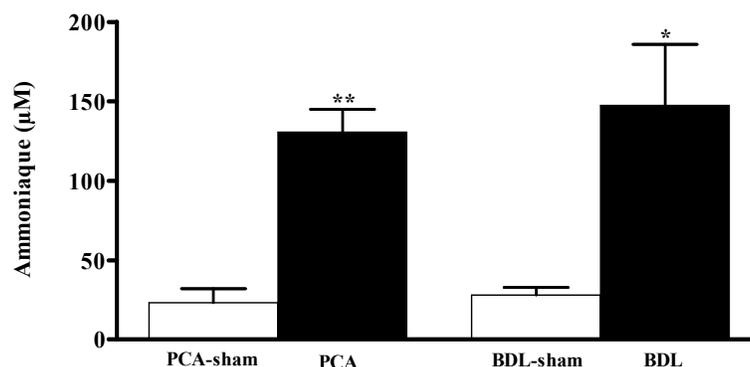


Figure 21. Niveau d'ammoniaque dans le plasma artériel (A) et le LCR (B) chez les rats avec PCA et BDL.

Une augmentation significative d'ammoniaque dans le plasma, ainsi que dans le LCR a été montrée chez les rats avec PCA ou avec BDL (en noir) comparativement aux rats avec sham-contrôles respectifs (en blanc). Les valeurs ont été exprimées par les moyennes \pm S.E.M. (N = 5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, comparé à leurs sham-contrôles respectifs.

Fonction hépatique

AST et ALT

L'activité de deux enzymes du foie, les aminotransférases de l'aspartate (AST), de l'alanine (ALT) a été mesurée dans le plasma afin de caractériser la fonction du foie chez les rats avec PCA et BDL (Tableau III). Dans le cas des rats avec PCA, une augmentation significative de l'AST comparativement aux rats sham-contrôles a été démontrée (1,2 fois). Cependant, pour l'ALT, aucune différence significative n'a été constatée entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles. Chez les rats avec BDL, l'AST et l'ALT ont été notées comme étant significativement augmentées dans les rats avec BDL versus les rats avec BDL sham-contrôles (5,3 et 1,6 fois respectivement).

Tableau III. Indicateurs de la fonction du foie

	PCA-sham	PCA	BDL-sham	BDL
AST (U/L)	68,0 ± 4,7	83,8 ± 2,6*	65,5 ± 4,3	354,8 ± 75,7**
ALT (U/L)	46,0 ± 2,4	53,5 ± 2,6	44,5 ± 3,9	72,3 ± 8,6*

Les valeurs ont été exprimées par les moyennes ± S.E.M. (N = 5). AST, ALT : les aminotransférases de l'aspartate et de l'alanine. *p < 0,05; **p < 0,01, comparé à leurs sham-contrôles respectifs.

2. STRESS OXYDATIF/NITROSATIF DANS LES RATS AVEC PCA ET BDL

ROS

Le mécanisme de la neurotoxicité de l'ammoniaque n'est pas complètement compris, mais le stress oxydatif induit par l'hyperammoniémie a été proposé d'être impliqué dans la pathogénèse de l'EH (Norenberg et al., 2004). Plusieurs paramètres du stress oxydatif/nitrosatif ont été évalués dans la présente étude afin de déterminer les modifications de protéines dues au stress oxydatif/nitrosatif chez les rats avec PCA et BDL, deux modèles de l'EH chronique.

Dans le plasma

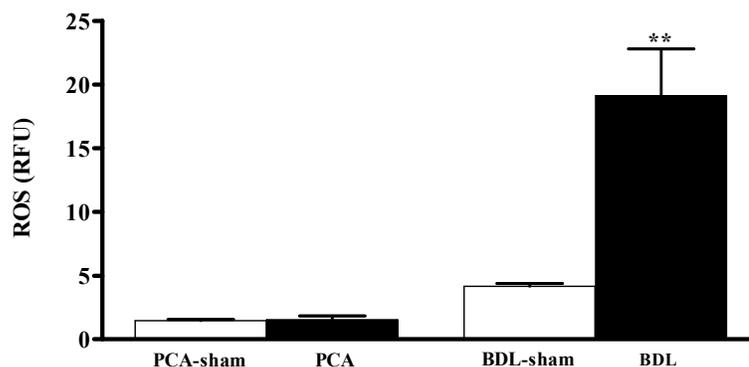
Vu qu'une production excessive de ROS endommage les composants cellulaires incluant les membranes, les protéines, les lipides et l'ADN (Valko et al., 2007), le niveau total de ROS dans le plasma artériel et le LCR a été mesuré chez les rats avec PCA et BDL. Le DCFDA permet la quantification non-spécifique des ROS, toutefois l'hydroxyle et le peroxy-nitrite sont les formes qui sont majoritairement détectées (Setsukinai et al., 2003). La Figure 22A montre un niveau similaire de ROS plasmatique entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles ($1,47 \text{ RFU} \pm 0,07$ vs $1,46 \text{ RFU} \pm 0,24$ respectivement). Au contraire, une augmentation significative de ROS (5,3 fois) a été constatée dans le plasma artériel des rats avec BDL comparativement aux rats avec BDL sham-contrôles ($19,1 \text{ RFU} \pm 3,6$ vs $4,1 \text{ RFU} \pm 0,2$ respectivement, $p < 0,01$).

Dans le LCR

Le niveau de ROS dans le LCR est montré par la Figure 22B où aucune différence significative de ROS n'a été observée entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles ($38,3 \text{ RFU} \pm 9,4$ vs $27,7 \text{ RFU} \pm 8,7$ respectivement). Une absence de différence dans le niveau des ROS dans le LCR a aussi été notée entre les rats avec

BDL et les rats avec BDL sham-contrôles ($25,9 \text{ RFU} \pm 8,2$ vs $27,6 \text{ RFU} \pm 7,2$ respectivement).

(A) Plasma



(B) LCR

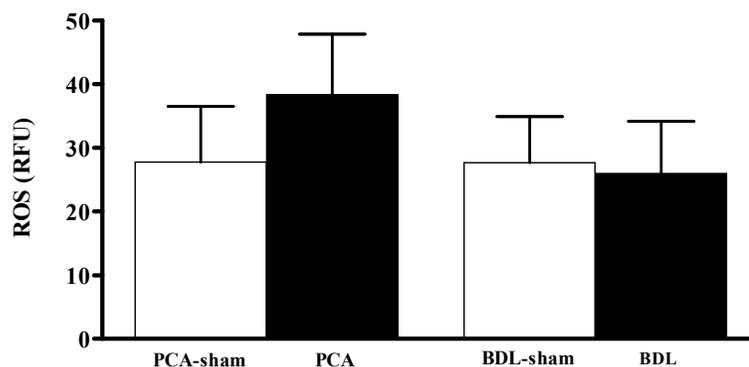


Figure 22. Niveau de ROS dans le plasma artériel (A) et le LCR (B) chez les rats avec PCA et BDL.

Une augmentation significative de ROS (RFU: *Relative fluorescence unit*) a été montrée dans le plasma des rats avec BDL comparativement aux rats avec BDL sham-contrôles. Aucun changement de ROS n'a été découvert dans le plasma, ni le LCR dans les rats avec PCA versus les rats avec PCA sham-contrôles. Les valeurs ont été exprimées par les moyennes \pm S.E.M. (N = 5). **p < 0,01, comparé à BDL sham-contrôles.

Peroxydation de lipides

HNE et MDA sont deux marqueurs de la peroxydation lipidique qui sont caractérisés par leur groupe aldéhydique. Ceux-ci possèdent une forte réactivité avec les résidus d'acides aminés des protéines, résultant en des dérivés de HNE ou MDA. Ces dérivés, par l'interaction aux chaînes latérales de protéines, génèrent par la suite des complexes protéine-protéine, ce qui influence la fonction des protéines (Stadtman, 2006). Le niveau de la peroxydation lipidique a été évalué dans le plasma artériel et dans le cortex frontal afin de déterminer la présence d'un stress oxydatif chez les rats de nos deux modèles.

Dérivés de HNE

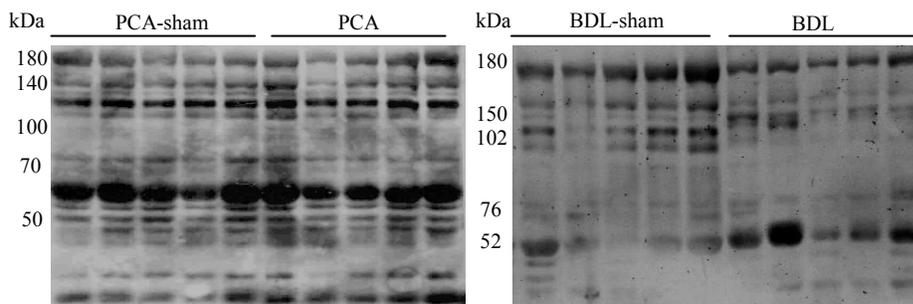
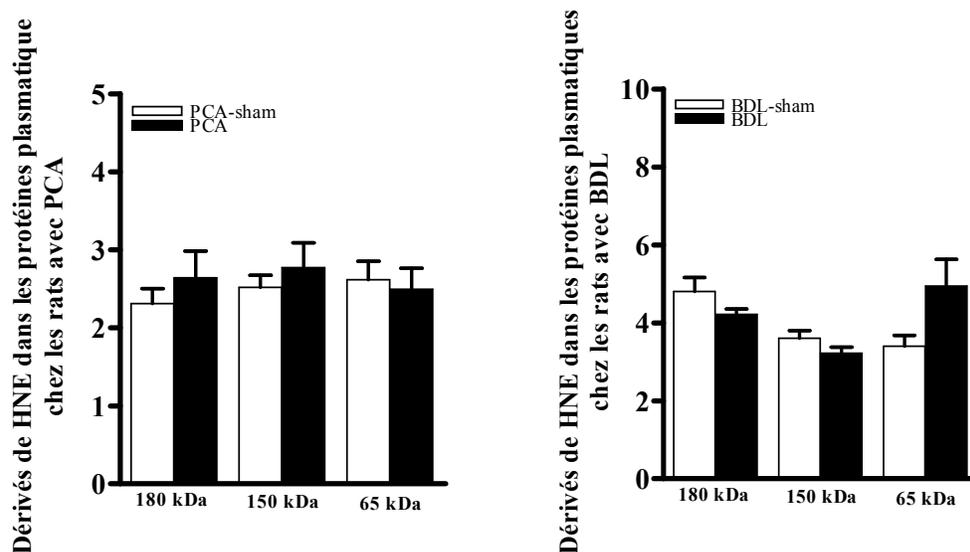
À l'aide de la technique d'immunobuvardage de type Western, les dérivés de HNE ont été évalués dans les protéines plasmatiques et cérébrales (Figure 23 et 24).

Dans les protéines plasmatiques

Un niveau similaire de dérivés de HNE entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles a été observé dans les protéines plasmatiques. Dans le cas de rats avec BDL, aucune différence significative de dérivés de HNE dans les protéines plasmatiques n'a été notée entre ces deux groupes de rats.

Dans les protéines cérébrales (cortex frontal)

La Figure 24 montre les dérivés de HNE dans les protéines cérébrales où un niveau similaire de ces dérivés a été observé entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles. Dans les groupes de rats avec BDL, le niveau de dérivés de HNE dans les protéines du cortex frontal a aussi été noté sans changement significatif entre les rats avec BDL et les rats avec BDL sham-contrôles.

(A) Protéines plasmatiques**(B) Quantification****Figure 23. Immunobuvardage de dérivés de HNE dans les protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL.**

(A) : Les lysats du plasma artériel (50 μ g) provenant de groupes de PCA (gauche) ou de BDL (droite) étaient analysés par immunobuvardage avec l'anti-HNE. Les marqueurs de masses moléculaires (kDa) sont indiqués sur le côté gauche de la figure. (B) : La quantification de bandes (180 kDa, 150 kDa et 65 kDa) chez les rats avec PCA ou BDL n'a montré aucune différence dans le niveau de dérivés de HNE entre les rats avec PCA ou BDL (en noir) et les rats avec PCA ou BDL sham-contrôles (en blanc). Les valeurs ont été exprimées par les moyennes \pm S.E.M. (N = 5).

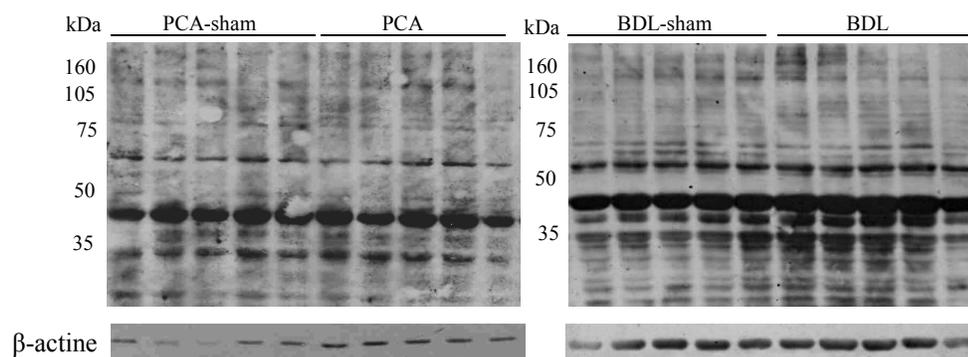
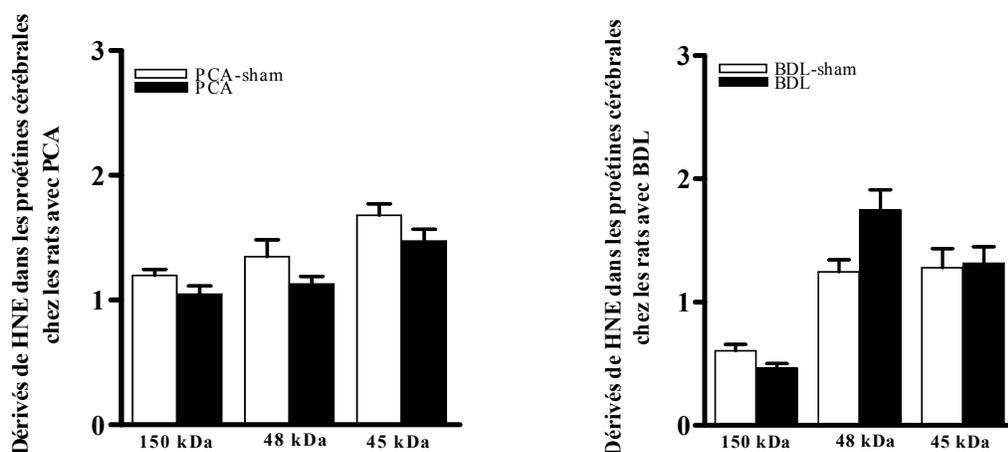
(A) Protéines cérébrales**(B) Quantification**

Figure 24. Immunobuvardage de dérivés de HNE dans les protéines du cortex frontal chez les rats avec PCA et BDL.

(A) : Les lysats du cortex frontal (75 μ g) provenant de groupes de PCA (gauche) ou de BDL (droite) étaient analysés par immunobuvardage avec l'anti-HNE. La protéine contrôle du cortex frontal, β -actine est en bas de dérivés de HNE dans les protéines cérébrales. Les marqueurs de masses moléculaires (kDa) sont indiqués sur le côté gauche de la figure. (B) : La quantification de bandes (150 kDa, 48 kDa et 45 kDa) chez les rats avec PCA ou BDL n'a démontré aucun changement dans le niveau de dérivés de HNE entre les rats avec PCA ou BDL (en noir) et les rats avec PCA ou BDL sham-contrôles (en blanc). Les valeurs ont été normalisées avec celles de β -actine, qui sont les moyennes \pm S.E.M. (N = 5).

MDA

MDA, un autre marqueur de la peroxydation de lipides, est aussi largement utilisé pour évaluer le stress oxydatif. Dans la présente étude, la concentration de MDA libre dans le plasma et son niveau sur les protéines cérébrales ont été mesurés par des trousseaux commerciales.

Dans le plasma

La Figure 25A montre le niveau de MDA dans le plasma, où aucun changement significatif de MDA n'a été noté entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles ($11,7 \mu\text{M} \pm 1,4$ vs $8,1 \mu\text{M} \pm 1,0$ respectivement). Au contraire, il a été constaté une augmentation significative de MDA dans le plasma des rats avec BDL par rapport aux rats avec BDL sham-contrôles ($p < 0,001$). Ainsi, la concentration de MDA dans le plasma des rats avec BDL était 3,5 fois plus élevée que celle des rats avec BDL sham-contrôles ($35,6 \mu\text{M} \pm 4,7$ vs $10,2 \mu\text{M} \pm 0,6$ respectivement).

Dans les protéines cérébrales

En ce qui concerne MDA dans les protéines cérébrales, aucun changement significatif n'a été démontré entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles ($1,7 \mu\text{M} \pm 0,2$ vs $2,4 \mu\text{M} \pm 0,1$ respectivement) (Figure 25B). Le même résultat a été obtenu chez les rats avec BDL, où un niveau similaire de MDA dans les protéines cérébrales était noté entre les deux groupes de rats ($6,4 \mu\text{M} \pm 0,3$ vs $5,8 \mu\text{M} \pm 0,4$ respectivement).

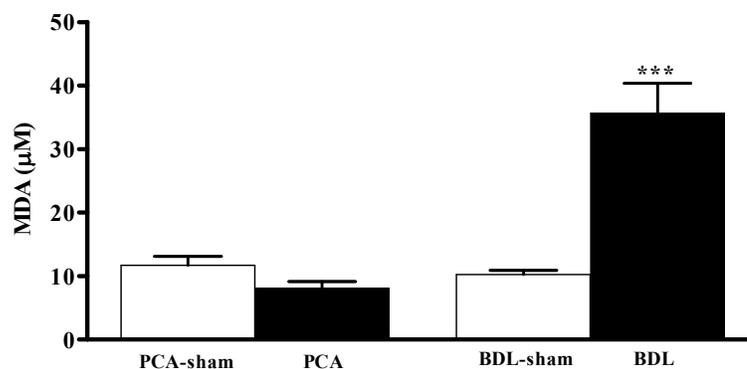
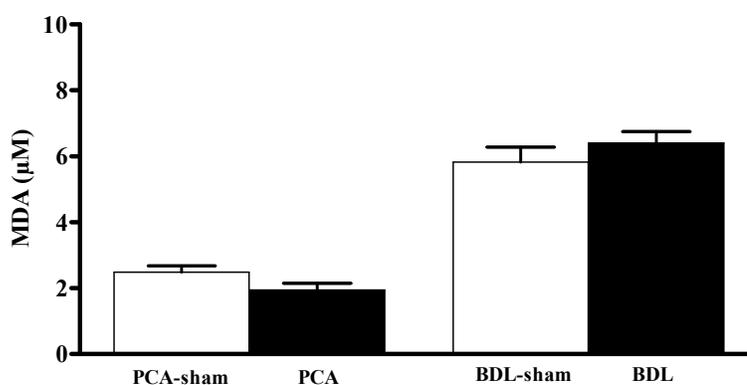
(A) Plasma**(B) Protéines cérébrales**

Figure 25. Niveau de MDA dans le plasma artériel (A) et dans les protéines du cortex frontal (B) chez les rats avec PCA et BDL. Une augmentation significative de MDA dans le plasma a été démontrée dans les rats avec BDL (en noir) comparativement aux rats avec BDL sham-contrôles (en blanc). Aucune différence significative entre les deux groupes de rats avec PCA n'a par contre été découverte. Les valeurs ont été exprimées par les moyennes \pm S.E.M. (N = 5). *** $p < 0,001$, comparé à BDL sham-contrôles.

Carbonylation de protéines

Un autre marqueur du stress oxydatif, la carbonylation de protéines, a aussi été évalué. La carbonylation de protéines (ajout d'un groupe carbonyle, C=O) est une modification post-traductionnelle, oxydative et irréversible, qui conduit à une dégradation ou une inactivation des protéines (Levine, 2002; Nyström, 2005). En outre, l'analyse biochimique a révélé que les groupes carbonyles introduits dans les chaînes latérales de certains acides aminés pouvaient déclencher les étapes initiales de la dégradation de protéines (Levine, 1983; Levine, 2002). Dans la présente étude, les groupes carbonyles dans les chaînes latérales de protéines ont été évalués à l'aide de l'immunobuvardage après dérivation par le DNPH.

Dans les protéines plasmatiques

La Figure 26A montre les dérivés de groupes carbonyles dans les protéines chez les rats avec PCA ou chez les rats avec BDL dans les protéines plasmatiques. Un niveau similaire de la carbonylation de protéines plasmatiques a été observé entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles. Le même résultat a été constaté chez les rats avec BDL.

Dans les protéines cérébrales

En ce qui concerne le statut de la carbonylation de protéines dans le cerveau, un niveau similaire de dérivés de groupes carbonyles a été observé entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles, ainsi qu'entre les rats avec BDL et les rats avec BDL sham-contrôles (Figure 26B) (quantification non-montrée).

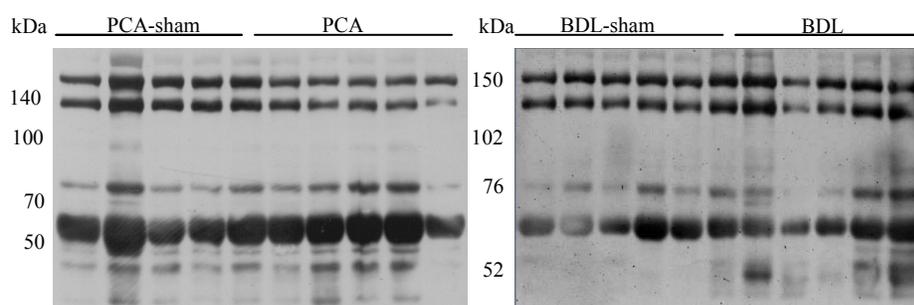
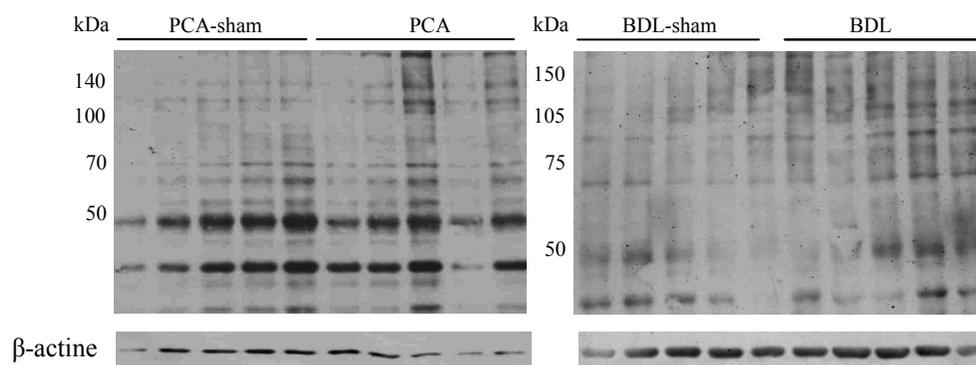
(A) Protéines plasmatiques**(B) Protéines cérébrales**

Figure 26. Immunobuvardage de la carbonylation de protéines du plasma artériel (A) et du cortex frontal (B) chez les rats avec PCA et BDL

L'évaluation du niveau de la carbonylation dans les chaînes latérales de protéines a été réalisée par la détection de dérivés de DNPH à l'aide de l'immunobuvardage avec l'anti-DNPH. La protéine contrôle du cortex frontal, β -actine est en bas des dérivés de groupes carbonyles dans les protéines cérébrales. Les marqueurs de masses moléculaires (kDa) sont indiqués sur le côté gauche de la figure.

Glutathionylation de protéines

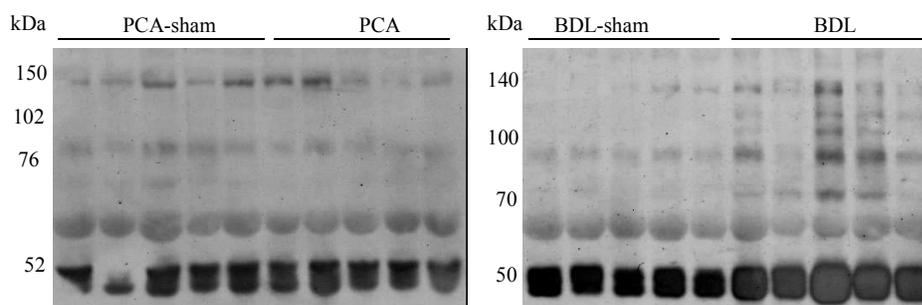
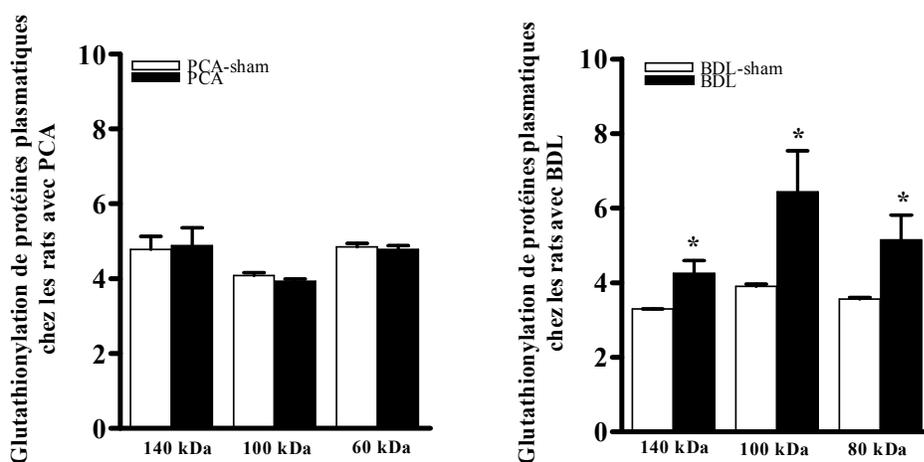
La glutathionylation de protéines est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par l'ajout d'un tripeptide glutathion (GSH). La conséquence de cette modification est une formation d'un pont disulfure entre les protéines et GSH. La glutathionylation de protéines permet de réguler la balance du redox du thiol. Bien que la glutathionylation soit physiologique et réversible, l'augmentation de la glutathionylation affecte la fonction de nombreuses protéines impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives (Di Domenico et al., 2009; Sharma et al., 2008). La glutathionylation est donc devenue un marqueur important du stress oxydatif ces dernières années.

Dans les protéines plasmatiques

Le niveau de la glutathionylation de protéines a été évalué par immunobuvardage en détectant les dérivés de GSH dans les protéines plasmatiques (Figure 27) et cérébrales (Figure 28). Un niveau similaire de dérivés de GSH dans les protéines plasmatiques a été constaté entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles. Pourtant, une augmentation significative de dérivés de GSH a été observée dans les protéines plasmatiques des rats avec BDL comparativement aux rats avec BDL sham-contrôles. La quantification des bandes a démontré cette augmentation significative dans les rats avec BDL pour les bandes situées à 140 kDa (1,3 fois, $4,2 \pm 0,3$ vs $3,2 \pm 0,1$ respectivement, $p < 0,05$), à 100 kDa (1,6 fois, $6,4 \pm 1,0$ vs $3,9 \pm 0,1$ respectivement, $p < 0,05$) et à 80 kDa (1,4 fois, $5,1 \pm 0,6$ vs $3,5 \pm 0,1$ respectivement, $p < 0,05$).

Dans les protéines cérébrales

Par contre, ce changement dans la glutathionylation n'a pas été noté dans les protéines cérébrales chez les rats avec PCA, ni avec BDL (Figure 28) (quantification non-montrée).

(A) Protéines plasmatiques**(B) Quantification****Figure 27. Immunobuvardage de la glutathionylation dans les protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL.**

(A) : Les lysats du plasma artériel (50 µg) provenant de groupes de PCA (gauche) ou de BDL (droite) ont été analysés par l'immunobuvardage avec l'anti-GSH. Les masses moléculaires (kDa) sont indiquées sur le côté gauche de la figure. (B) : La quantification de bandes chez les rats avec BDL (en noir) a démontré une augmentation significative pour les bandes situées à 140 kDa, 100 kDa et 80 kDa comparativement aux bandes respectives chez les rats avec BDL sham-contrôles (en blanc). Cependant, la quantification des bandes n'a pas démontré un changement significatif entre les rats avec PCA versus celles des rats avec PCA sham-contrôles. Les valeurs ont été exprimées par les moyennes ± S.E.M. (N = 5). *p < 0,05, comparé à BDL sham-contrôles.

Protéines cérébrales

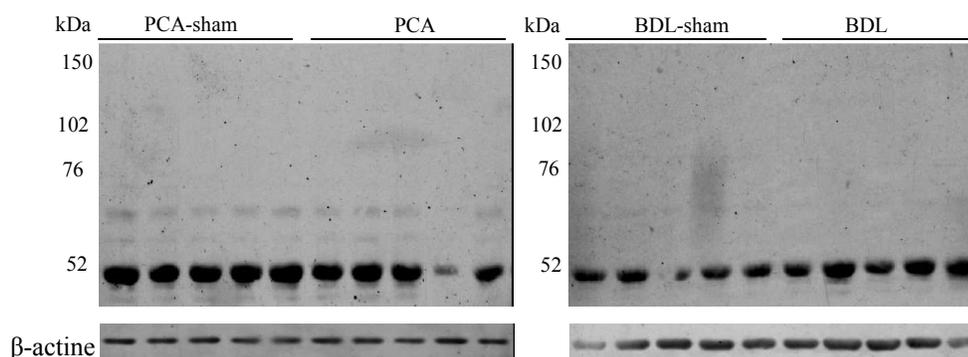


Figure 28. Immunobuvardage de la glutathionylation de protéines du cortex frontal chez les rats avec PCA et BDL.

Les lysats du cortex frontal (75 μ g) provenant de groupes de PCA (gauche) ou de BDL (droite) ont été analysés par immunobuvardage avec un anticorps anti-GSH. La protéine contrôle du cortex frontal, β -actine est montrée sous les dérivés de GSH. Les masses moléculaires (kDa) sont indiquées sur le côté gauche de la figure.

S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines

L'oxyde nitrique (NO) et son dérivé le peroxynitrite (ONOO \cdot) sont les deux principaux RNS affectant les protéines, les lipides et l'ADN dans les cellules. L'oxydation du résidu cystéine de protéines par le NO se nomme la S-nitrosylation de protéines. Bien que ce processus nitrosatif soit physiologique et réversible, un déséquilibre de la S-nitrosylation de protéines a déjà été démontré sous conditions de stress nitrosatif dans plusieurs maladies neurodégénératives (Horiguchi et al., 2003; Yao et al., 2004). Il est proposé que la S-nitrosylation du résidu cystéine due au stress nitrosatif soit un contributeur majeur dans le développement de ces maladies (Chung, 2006-2007; Gow et al., 2002). Ce processus est donc considéré comme un indicateur important du stress nitrosatif.

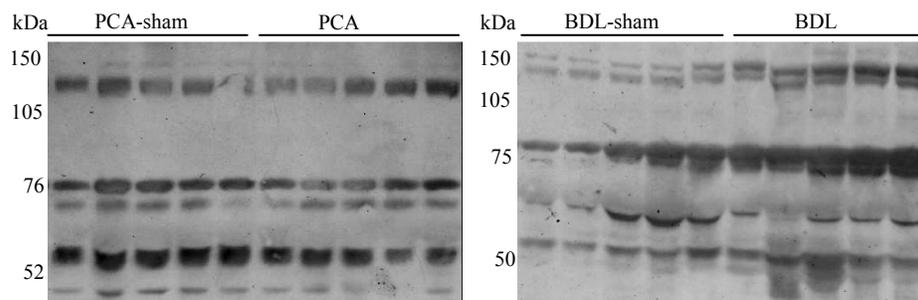
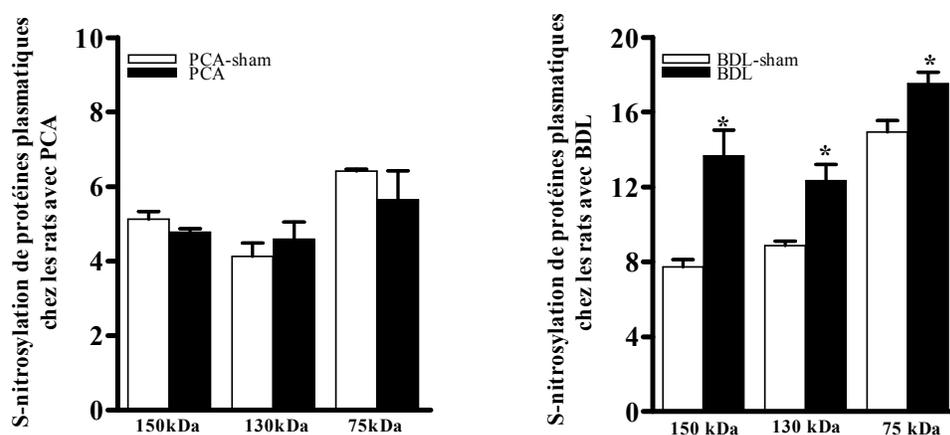
Dans les protéines plasmatiques

L'évaluation du niveau de la S-nitrosylation a été réalisée par la détection de dérivés de S-nitrosylation de la cystéine en utilisant l'immunobuvardage. La Figure 29 montre la S-nitrosylation dans les protéines plasmatiques chez les rats avec PCA et avec BDL. Aucun changement significatif de dérivés de S-nitrosylation dans les protéines plasmatiques n'a été observé entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles.

Dans le cas de BDL, une augmentation significative de dérivés de S-nitrosylation a été observée dans les protéines plasmatiques pour les rats avec BDL versus les rats avec BDL sham-contrôles. La quantification de bandes a démontré une augmentation significative de trois bandes pour le groupe BDL versus BDL sham-contrôles ($p < 0,05$). Le niveau de dérivés de la S-nitrosylation du résidu cystéine dans les protéines de masse moléculaire de 150 kDa était 1,7 fois plus élevé dans les rats avec BDL que dans les rats avec BDL sham-contrôles ($13,6 \pm 1,3$ vs $7,7 \pm 0,3$ respectivement, $p < 0,05$). Les dérivés dans les protéines de 130 kDa étaient 1,4 fois plus élevés chez les rats avec BDL versus leurs rats sham-contrôles ($12,3 \pm 0,8$ vs $8,8 \pm 0,2$ respectivement, $p < 0,05$) et 1,1 fois plus élevés pour les protéines de masses moléculaire de 75 kDa ($17,5 \pm 0,6$ vs $14,9 \pm 0,6$ respectivement, $p < 0,05$).

Dans les protéines cérébrales

Le niveau de la S-nitrosylation dans les protéines cérébrales est montré à la Figure 30. Une augmentation de dérivés de S-nitrosylation dans les protéines cérébrales a été démontrée chez les rats avec PCA versus leur groupe sham-contrôles. La quantification de bandes a démontré une augmentation significative (1,4 fois) dans les protéines de 75 kDa ($0,97 \pm 0,06$ vs $0,67 \pm 0,08$ respectivement, $p < 0,05$) chez les rats avec PCA versus leurs rats sham-contrôles. Chez les rats avec BDL, le niveau de dérivés cérébraux de S-nitrosylation n'a pas démontré une différence significative entre les rats avec BDL et les rats avec BDL sham-contrôles.

(A) Protéines plasmatiques**(B) Quantification****Figure 29. Immunobuvardage de la S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines du plasma artériel chez les rats avec PCA et BDL.**

(A) : Les lysats du plasma artériel (50 µg) provenant de groupes de PCA ou de BDL ont été analysés par immunobuvardage avec l'anti-S-nitrosylation. Les masses moléculaires (kDa) sont indiquées sur le côté gauche de la figure. (B) : La quantification de bandes chez les rats avec BDL (en noir) a démontré une augmentation significative dans les bandes se situant à 150 kDa, 130 kDa et 75 kDa comparativement à leurs bandes respectives chez les rats sham-contrôles (en blanc). Cependant, aucun changement significatif dans ces bandes n'a été détecté entre les rats avec PCA et les rats avec PCA sham-contrôles. Les valeurs ont été exprimées par les moyennes ± S.E.M. (N = 5). *p < 0,05, comparé à BDL sham-contrôles.

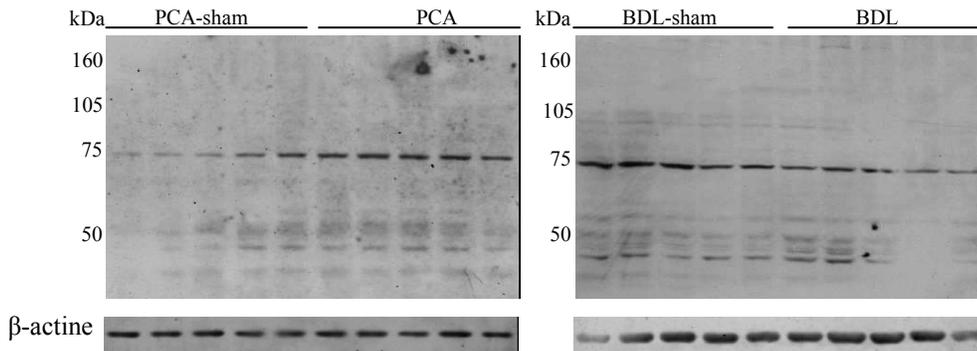
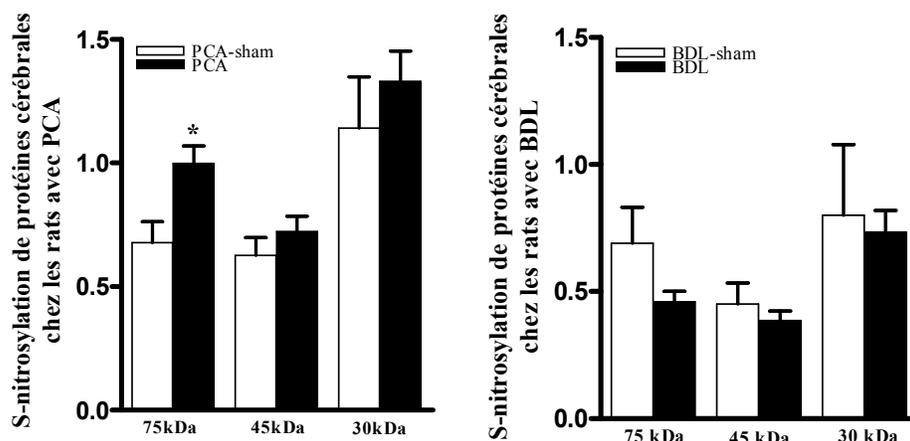
(A) Protéines cérébrales**(B) Quantification**

Figure 30. Immunobuvardage de la S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines cérébrales chez les rats avec PCA et BDL.

(A) : Les lysats du cortex frontal (75 μ g) provenant de groupes de PCA ou de BDL étaient analysés par l'immunobuvardage avec l'anti-S-nitrosylation. La protéine contrôle du cortex frontal, β -actine est montrée sous les dérivés de S-nitrosylation de protéines cérébrales. Les masses moléculaires (kDa) sont indiquées sur le côté gauche de la figure. (B) : La quantification de bandes a seulement démontré une augmentation significative pour la bande située à 75 kDa chez les rats avec PCA (en noir), comparativement à la bande des sham-contrôles (en blanc). Les valeurs ont été normalisées avec celles de β -actine, exprimées par les moyennes \pm S.E.M. (N = 5). *p < 0,05, comparé à PCA sham-contrôles.

DISCUSSION

- 1. Ammoniaque et l'encéphalopathie hépatique*
- 2. Stress oxydatif/nitrosatif dans l'encéphalopathie hépatique minimale*
- 3. Relation entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif*
- 4. Relation entre l'œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif*
- 5. Action synergique de l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif*
- 6. Perspectives*
- 7. Résumé*

1. HYPERAMMONIÉMIE DANS L'EHM

L'EH est un spectre d'anomalies neuropsychiatriques due aux maladies hépatiques. Le mécanisme pathologique de cette complication n'est pas clair. L'hypothèse de l'ammoniaque est une proposition clé parmi toutes les explications de l'EH. L'ammoniaque est neurotoxique, de nombreux effets de cette neurotoxicité ont déjà été rapportés, cependant le stress oxydatif/nitrosatif induit par l'hyperammoniémie reste indéfini.

Dans la présente étude, les rats avec PCA et BDL, les deux modèles de l'EHM ont été utilisés afin d'évaluer le rôle du stress oxydatif/nitrosatif. La concentration de l'ammoniaque a été mesurée dans le plasma et le LCR dans deux modèles de l'EHM et une hyperammoniémie chez les rats avec PCA et BDL a été montrée (142 μM et 129 μM respectivement). Un niveau élevé d'ammoniaque est aussi présent dans le cerveau de ces deux modèles de rats (135 μM et 147 μM respectivement). L'hyperammoniémie dans ces deux modèles de l'EHM est relativement basse comparativement aux rats atteints d'une insuffisance hépatique aiguë, chez lesquels a été observé une concentration élevée, de l'ordre de 1,5 mM et 710 μM dans le plasma et le cerveau respectivement (Reddy et al., 2004; Sathyasaikumar et al., 2007)

Les deux différents modèles de l'EHM présentent le même niveau d'hyperammoniémie. Un niveau autour de 135 μM mesuré dans la présente étude est confirmé par d'autres études sur l'EHM, qui ont observé une augmentation de deux ou trois fois la concentration normale (Butterworth, 2002). De nombreuses conséquences de l'élévation de l'ammoniaque sur le SNC ont déjà été décrites (Albrecht and Jones, 1999; Albrecht and Norenberg, 2006; Bosoi and Rose, 2009; Hazell and Butterworth, 1999; Norenberg et al., 2007; Norenberg, 1998). En plus, des études récentes ont proposé une implication du stress oxydatif/nitrosatif dans la neurotoxicité de l'ammoniaque (Norenberg et al., 2004; Sathyasaikumar et al., 2007).

2. STRESS OXYDATIF/NITROSATIF DANS L'EHM

Plusieurs marqueurs, par exemple la peroxydation de lipides, la carbonylation, la glutathionylation et la S-nitrosylation de protéines ont été utilisés afin de mesurer les modifications oxydatives de protéines dans le plasma et le cortex frontal chez les deux modèles de l'EHM.

Stress oxydatif dans l'EHM

Peroxydation de lipides

Les lipides sont un des composants de la membrane cellulaire. Le métabolisme de lipides dans le SNC est particulièrement important parce que cet organe possède la concentration la plus élevée de lipides mis à part le tissu adipeux (Esterbauer et al., 1991). La peroxydation de lipides se produit en réponse au stress oxydatif et une grande diversité d'aldéhydes est formée lorsque les lipides se décomposent. Certains de ces aldéhydes (HNE et MDA) sont réactifs et sont considérés comme les messagers secondaires toxiques qui augmentent le nombre de radicaux libres initiaux (Esterbauer et al., 1991).

HNE dans l'EHM

La mesure du HNE est reconnue comme un paradigme pour étudier les effets pathologiques de produits cytotoxiques de la peroxydation lipidique (Schneider et al., 2008). Le HNE est neurotoxique et peut endommager la barrière hémato-encéphalique (Newcombe et al., 1994). Une augmentation significative du niveau de HNE et de dérivés de HNE dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a été observée (Reed et al., 2009; Williams et al., 2006). Une augmentation du niveau de HNE dans le sérum et le LCR a aussi été observée chez les patients de la sclérose latérale amyotrophique (Simpson et al., 2004).

L'élévation du niveau de HNE conduit souvent à des complexes protéine-protéine, ce qui altère la fonction des protéines. L'inactivation ou la modification du système protéolytique par HNE ont été démontrées dans les cellules (Okada et al., 1999). Les études sur les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ont démontré que l'activité du protéasome était détériorée par le HNE, signifiant une diminution de la capacité à dégrader les protéines erronées (McNaught et al., 2001; Pedersen et al., 1998; Shringarpure et al., 2000; Yoritaka et al., 1996). De plus, la modification par HNE a été observée dans certaines protéines spécifiques impliquées dans ces maladies telles le transporteur du glutamate et la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, ce qui provoque une inactivation de ces protéines (Lauderback et al., 2001; Pedersen et al., 1998; Siems et al., 1996).

Dans la présente étude, les dérivés de HNE dans le plasma et le cortex frontal ont été évalués chez les rats avec PCA et BDL. Aucun changement n'a été noté dans les protéines plasmatiques et cérébrales de ces deux modèles. Ceci indique que les protéines dans le plasma et dans le tissu cérébral ne sont pas modifiées par des dérivés de HNE chez les rats avec PCA et BDL.

MDA dans l'EHM

Le MDA est un autre aldéhyde majeur dans l'évaluation de la peroxydation de lipides (Del Rio et al., 2005). Le MDA est produit lors de la décomposition des acides gras insaturés. Le MDA libre peut se combiner aux groupements latéraux (libres) des protéines (essentiellement les résidus lysines), conduisant à la formation de dérivés de MDA, modifiant les propriétés biologiques des protéines (Michel et al., 2008). L'évaluation des MDA se fait principalement par la mesure de son niveau dans le plasma ou dans les protéines tissulaires (Lykkesfeldt, 2007). Une augmentation significative de MDA a été démontrée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Delibas et al., 2002) et de la sclérose latérale amyotrophique (Bonfont-Rousselot et al., 2000).

Concernant l'EHM, les rats avec PCA n'ont pas montré un changement du niveau de MDA plasmatique, ni dans les protéines cérébrales. Par contre, il a été constaté que le niveau de MDA dans le plasma est augmenté chez les rats avec BDL.

Cependant aucune différence n'a été notée dans la concentration de MDA de protéines cérébrales chez les rats avec BDL.

Les HNE et MDA sont deux marqueurs de la peroxydation de lipides, or seul le MDA était augmenté dans le plasma des rats avec BDL. Les raisons pour lesquelles une augmentation de la peroxydation de lipides a été seulement observée pour le MDA nous sont inconnues. Cependant, les méthodes utilisées étaient différentes, dans un cas (MDA), ce sont les dérivés libres alors que l'autre (HNE) ce sont des dérivés liés aux protéines.

Carbonylation de protéines dans l'EHM

La carbonylation de protéines est un dommage oxydatif irréversible, conduisant souvent à une perte fonctionnelle de protéines. Cette modification de protéines est considérée comme un indicateur de l'altération oxydative sévère et de la dysfonction de protéines (Dalle-Donne et al., 2006). Ainsi, l'évaluation de groupes carbonyles sur les protéines est devenue une méthode pour la détection de la présence du stress oxydatif (Stadtman and Levine, 2003). Les protéines carbonylées modérément conduisent à une dégradation de protéines par le système protéasomique, tandis que les agrégats de protéines dus à la carbonylation de protéines endommagent les cellules et induisent l'apoptose ou la nécrose (Dalle-Donne et al., 2006).

Une formation accrue de groupes carbonyles dans le cerveau a été rapportée chez des patients et des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer (Smith et al., 1998). Un niveau élevé de groupes carbonyles de protéines a également été démontré chez les patients de la sclérose latérale amyotrophique (Bowling et al., 1993) et de la maladie de Parkinson (Floor and Wetzel, 1998).

Dans les rats avec PCA et BDL, les dérivés de groupes carbonyles dans la chaîne latérale de protéines ont été évalués dans le plasma et le cortex frontal. Cependant, aucun changement de ces dérivés n'a été trouvé dans les protéines plasmatiques, ni dans les protéines cérébrales chez les PCA ou les BDL.

En effet, le groupe carbonyle est fortement associé avec HNE parce que l'introduction de groupes carbonyles peut se produire via les réactions covalentes avec

les aldéhydes tels HNE et MDA (Poon et al., 2004). Un résultat similaire de ces deux marqueurs n'est donc pas surprenant.

Glutathionylation de protéines dans l'EHM

Le glutathion, par le ratio de sa forme réduite (GSH) et de sa forme oxydée (GSSG) reflète le statut du stress oxydatif. Plusieurs méthodes sont utilisées afin d'évaluer le statut du glutathion dont la concentration totale du GSH, le ratio GSH/GSSG et les protéines glutathionylées. Sous conditions de stress oxydatif, l'oxydation du résidu cystéine forme un pont disulfure entre le thiol d'une protéine et le thiol du GSH, ce qui se nomme la glutathionylation de protéines.

Une diminution du GSH total, du ratio de GSH/GSSG et une glutathionylation de protéines ont été constatées dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (Bermejo et al., 2008; Newman et al., 2007). Le GSH est aussi impliqué dans la maladie de Parkinson (Jenner, 2003; Sharma et al., 2008).

La glutathionylation de protéines a été évaluée dans les modèles de l'EHM. Il n'a pas été constaté de changement du niveau de la glutathionylation dans les protéines plasmatiques et cérébrales chez les rats avec PCA. Cependant, un niveau élevé de la glutathionylation dans les protéines plasmatiques a été noté chez les rats avec BDL. Or, cette augmentation n'a pas été montrée dans le cerveau des rats avec BDL.

L'augmentation de la glutathionylation de protéines dans le plasma des rats avec BDL suggère qu'un stress oxydatif systémique est présent dans ces rats. Par contre, le stress oxydatif n'est pas présent dans le SNC des rats avec BDL, ni dans le plasma et ni dans le SNC des rats avec PCA.

ROS dans l'EHM

Il n'a pas été démontré d'augmentation des ROS dans le plasma, ni dans le LCR des rats avec PCA. Cependant, une augmentation de ROS a été notée dans le plasma des rats avec BDL, mais le niveau de ROS n'était pas changé dans le LCR chez les rats avec BDL.

L'augmentation de ROS plasmatique confirme la présence du stress oxydatif systémique dans les rats avec BDL. L'absence du stress oxydatif dans le cerveau des rats avec BDL est prouvée par un niveau normal de ROS cérébral. Chez les rats avec PCA, le stress oxydatif n'est pas présent, ni dans le plasma, ni dans le cerveau, ceci confirme aussi le niveau normal de ROS chez les rats avec PCA.

L'absence du stress oxydatif/nitrosatif dans le cortex des rats avec BDL suggère que les ROS élevés dans le sang ne soient pas entrés dans le cerveau. Le fonctionnement normal de la barrière hémato-encéphalique est proposé, et ainsi que cette dernière est capable d'empêcher la pénétration de ROS plasmatiques vers le cerveau. Il est aussi possible que les ROS puissent entrer dans le cerveau, mais que les antioxydants cérébraux soient capables de les inhiber (Figure 31).

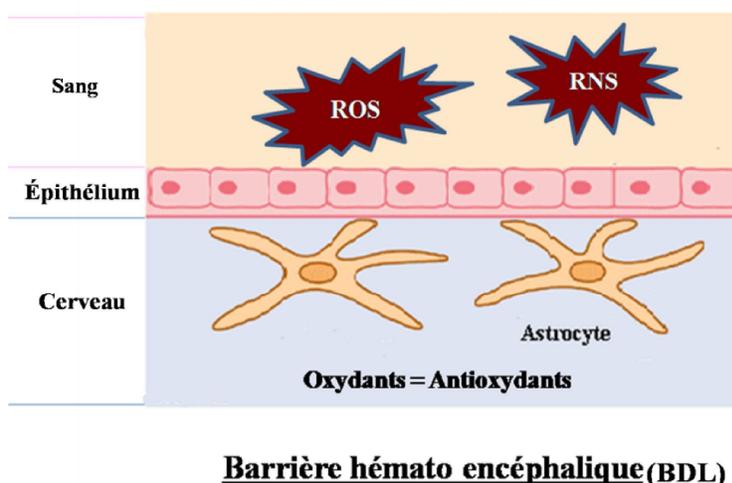


Figure 31. Barrière hémato-encéphalique chez les rats avec BDL

Chez les rats avec BDL, un stress oxydatif/nitrosatif est présent dans le sang. Mais aucun stress oxydatif, ni nitrosatif est montré dans le cerveau. Ces observations suggèrent que les ROS ou RNS dans le sang de BDL n'entrent pas dans le cerveau. Il est possible que ces ROS ou RNS soient entrés dans le cerveau, cependant, un système antioxydant normal est capable de les enlever, ce qui permet de maintenir un équilibre entre les oxydants et les antioxydants.

Stress nitrosatif dans l'EHM

S-nitrosylation de protéines dans l'EHM

Le NO est une molécule de signalisation qui contrôle de nombreux processus biologiques, et il est connu pour son rôle de vasodilatation. Une production élevée de NO en conditions pathologiques permet de former les peroxynitrites, qui induisent ensuite une nitration de protéines. Un type de la nitration par le NO se nomme la S-nitrosylation du résidu cystéine de protéines, qui introduit un NO sur la cystéine de protéines. La S-nitrosylation est un processus réversible qui permet de réguler l'homéostasie du redox. Cependant, l'association de ce processus avec plusieurs maladies neurologiques a déjà été rapportée (Pacher et al., 2007). Par exemple, la déplétion de la S-nitrosylation dans la superoxyde dismutase 1 (SOD1) mutée contribue à la pathogénèse de la sclérose latérale amyotrophique (Schonhoff et al., 2006). La parkine est une protéine impliquée dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson, il a déjà été démontré que sa S-nitrosylation a induit une diminution de la dégradation ubiquitinée de protéines (Yao et al., 2004). En outre, certaines études ont observé que la nitration de protéines induisait un repliement erroné de protéines, formant des agrégats ou une dysfonction de ces protéines (Nakamura and Lipton, 2009). Les agrégats dus à la nitration de protéines ont été démontrés dans la sclérose latérale amyotrophique, la tauopathie et la maladie de Parkinson (Duda et al., 2000; Horiguchi et al., 2003).

Dans ce projet, chez les rats avec l'EHM, aucune différence n'a été observée dans le niveau de S-nitrosylation dans les protéines plasmatiques chez les rats avec PCA. Par contre, une augmentation de S-nitrosylation de protéines a été notée dans les protéines cérébrales chez les rats avec PCA. Dans le cas de BDL, un niveau élevé de dérivés de S-nitrosylation a été noté dans les protéines plasmatiques des rats avec BDL. Aucune différence du niveau de la S-nitrosylation n'a été observée dans les protéines cérébrales chez les rats avec BDL.

Le niveau élevé de S-nitrosylation dans les protéines cérébrales suggère que le stress nitrosatif est présent dans le SNC des rats avec PCA. Par contre, le stress nitrosatif

n'est pas présent dans le plasma des rats avec PCA. Les rats avec BDL ne présentent pas un stress nitrosatif systémique, ni central.

Différence du stress oxydatif/nitrosatif entre les rats avec PCA et les rats avec BDL

Chez les rats avec PCA, le stress oxydatif n'est ni présent dans le plasma, ni dans le cerveau. Cependant, un stress nitrosatif est présent dans le cerveau, mais pas dans le plasma chez les rats avec PCA. En ce qui concerne le modèle de BDL, un stress oxydatif et nitrosatif est présent dans le plasma, mais pas dans le cerveau.

Absence du stress oxydatif systémique et central chez les rats avec PCA

Les raisons pour lesquelles un stress oxydatif n'est pas présent chez les rats avec PCA sont inconnues. Or, le niveau de l'hyperammoniémie pourrait être un facteur. En effet, les rats avec PCA représentent un modèle de l'EHM avec une hyperammoniémie modérée autour de 135 μM . Cette valeur est relativement basse par rapport à l'hyperammoniémie sévère (1,5 mM) observée dans les modèles de l'insuffisance hépatique aiguë (Sathyaikumar et al., 2007) ou les études *in vitro* (5 mM) (Norenberg et al., 2007; Warskulat et al., 2002), dans lesquels un stress oxydatif a été constaté.

Une absence de stress oxydatif chez les rats avec PCA peut s'expliquer par un système normal antioxydant. La présente étude montre un niveau normal de ROS chez les rats avec PCA, ce qui suggère que les antioxydants fonctionnent normalement, et peuvent donc enlever les ROS formés excessivement et transitoirement au début de l'hyperammoniémie. Hilgier et al. (2003) ont observé une accumulation transitoire de HO \cdot suivant l'intoxication aiguë par l'ammoniaque. Cette étude a montré que l'augmentation de HO \cdot a été observée 160 min après l'injection de l'ammoniaque, or le niveau de HO \cdot est retourné au niveau de base après 240 min. De plus, de nombreuses études ont déjà démontré que les antioxydants étaient efficaces pour traiter le stress oxydatif induit par l'hyperammoniémie (Bruck et al., 1999; Guerrini, 1994; Widmer et

al., 2007). Donc, il se peut que l'élévation transitoire de ROS due à l'hyperammoniémie induise une compensation par les antioxydants, qui sont capables d'enlever les ROS.

Le système antioxydant normal pourrait être dû à une fonction normale du foie. L'activité des enzymes antioxydantes telles SOD a été démontré diminuée chez les patients ou les rats atteints de cirrhose (Gracia-Sancho et al., 2008; Zuwała-Jagiello et al., 2009), indiquant que l'activité des enzymes antioxydantes soit associée avec la fonction du foie. Dans la présente étude, l'activité des enzymes de la fonction du foie, l'AST et l'ALT, a été évaluée chez les rats avec PCA et BDL. Dans les rats avec PCA, une augmentation significative de l'AST a été notée; tandis que l'ALT n'a pas été différente. Les résultats indiquent que la plupart des hépatocytes fonctionnent normalement chez les rats avec PCA. En effet, la chirurgie de l'anastomose portocave n'induit pas une dysfonction hépatique (Figure 5). Étant donné que la majorité des hépatocytes fonctionnent encore chez les rats avec PCA, l'activité des enzymes antioxydantes reste normale, ce qui permet de maintenir une balance entre les oxydants et les antioxydants.

Présence du stress nitrosatif central, et non systémique, chez les rats avec PCA

Le stress nitrosatif découvert chez les rats avec PCA dans la présente étude est confirmé par Schliess et al. (2002), qui ont observé une augmentation de dérivés de nitrotyrosine dans les protéines cérébrales chez les rats avec PCA. Le stress nitrosatif induit dans le cerveau des rats avec PCA peut s'expliquer par une augmentation de l'activité ou de l'expression de NOS dans le cerveau de ce modèle de l'EHM. Salter et al. (1991) suggèrent que l'activité de NOS dans le cerveau est la plus forte parmi tous les organes. De plus, une augmentation de l'activité et de l'expression de nNOS a été découverte dans le cerveau des rats avec PCA (Rao et al., 1995; Rao et al., 1997). Chez les rats avec PCA, il se peut alors qu'une élévation de l'activité et de l'expression de NOS soit induite par l'hyperammoniémie dans le cerveau et qu'une production de NO soit augmentée. Cette augmentation de NO cérébrale induirait en conséquence une formation élevée de RNS et un stress nitrosatif.

La présente étude montre que le stress nitrosatif, et non le stress oxydatif, est induit dans le cortex frontal des rats avec PCA. Ceci suggère une différence entre le

stress oxydatif et le stress nitrosatif dans le cerveau des rats avec PCA. Il est connu que les composants de ROS et de RNS sont différents : les ROS sont des dérivés réactifs de l'oxygène, tandis que les RNS sont des dérivés réactifs de l'azote. Aussi, le ROS primaire ($O_2^{\cdot-}$) est produit dans la mitochondrie; alors que NO, le RNS primaire est formé par NOS. Toutefois, les ROS et RNS sont tous des radicaux libres, des molécules réactives qui affectent les protéines, les lipides et les acides nucléaires. La formation de RNS est dépendante de $O_2^{\cdot-}$, par exemple les peroxynitrites sont formés par NO et $O_2^{\cdot-}$ ($O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^{\cdot-}$) (Figure 31). Cependant, la possibilité d'une formation élevée de RNS induite par un niveau accru de NO et un niveau physiologique de ROS tels $O_2^{\cdot-}$ reste à être définie.

<u>ROS</u>	<u>RNS</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▶ OH^{\cdot}, $O_2^{\cdot-}$, $CO_2^{\cdot-}$, O_2^{\cdot}, C^{\cdot}, RS^{\cdot}, RSO^{\cdot}, $RSSR^{\cdot}$, R^{\cdot}, RO^{\cdot}, CO_2^{\cdot}, ROO^{\cdot} ▶ Produit (O_2) dans la mitochondrie, ▶ ROS <ul style="list-style-type: none"> - attaquer les composants cellulaires et conduire à l'altération de cellules, - activer le système immunitaire inné, - oxyder les protéines et les lipides, peut stimuler la libération de cytokines 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ NO^{\cdot}, ONO_2^{\cdot}, $N_2O_2^{\cdot}$, NO_2^{\cdot}, $ONOCO_2^{\cdot-}$, $ONOO^{\cdot-}$ ▶ Produit (NO) par les NOS, ▶ NO <ul style="list-style-type: none"> - hypotension, hypoperfusion et hypoxie, - former le produit toxique $ONOO^{\cdot-}$ - $ONOO^{\cdot-}$ est un médiateur proinflammatoire et proapoptotique, - conduire à la mort neuronale, - nitration des protéines.

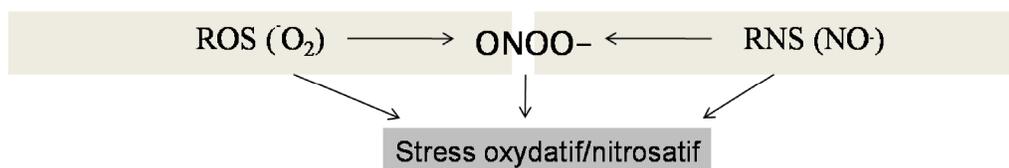


Figure 32. Différence entre ROS et RNS

Les ROS et les RNS sont différents composés et sont produits différemment. Ces deux groupes de radicaux libres sont tous toxiques aux cellules. Les composants ROS réagissent avec les RNS, ce qui aggrave le stress oxydatif/nitrosatif (image importée et modifiée de Dal-Pizzol et al. (2009)).

Présence du stress oxydatif/nitrosatif systémique, et non central chez les rats avec BDL

Le mécanisme du stress oxydatif/nitrosatif dans le plasma des rats avec BDL n'est pas clair. Étant donné que les ROS ont été observé comme étant augmentés dans le plasma des rats avec BDL, le niveau élevé de ROS plasmatique est une cause du stress oxydatif/nitrosatif dans le plasma des rats avec BDL. Toutefois, cette augmentation de ROS due à une diminution du système antioxydant ou une formation excessive de ROS dépassant la capacité de l'enlèvement des antioxydants reste à être déterminée chez les rats avec BDL.

De plus, l'augmentation du niveau de ROS peut être originaire d'une dysfonction du foie. L'activité des AST et ALT a été notée augmentée dans le plasma, ce qui signifie que le foie présente une dysfonction majeure chez ces rats avec BDL. Il est donc possible que la dysfonction hépatique induise une diminution de l'expression ou de l'activité des enzymes antioxydantes, en conséquence, ces antioxydants ne sont plus capables d'enlever les ROS excessifs chez les rats avec BDL. Cette hypothèse est confirmée par l'étude d'Aller et al. (2008), qui ont montré une diminution de la capacité du nettoyage de radicaux libres lors d'une dysfonction du foie.

L'hyperammoniémie est présente chez les rats avec BDL, il se peut aussi que le stress oxydatif/nitrosatif systémique observé soit dû à l'ammoniaque. Cependant, le même niveau d'hyperammoniémie dans le modèle de PCA n'induit pas un stress oxydatif/nitrosatif. Ceci suggère que le stress oxydatif/nitrosatif ne soit pas dû à l'hyperammoniémie dans l'EHM.

3. RELATION ENTRE L'HYPERAMMONIÉMIE ET LE STRESS OXYDATIF/NITROSATIF

Relation indirecte entre l'hyperammonémie et le stress oxydatif/nitrosatif

L'EH est un syndrome neuropsychiatrique réversible associé à une dysfonction hépatique chronique ou aiguë. Un aspect important de ce syndrome est la dérivation du sang portal dans la circulation systémique à travers les vaisseaux collatéraux portosystémiques, sans être filtré par les hépatocytes. L'ammoniaque, qui provient de la digestion des protéines de la nourriture entre dans la circulation systémique via la déviation portosystémique, ce qui induit une augmentation de la concentration de l'ammoniaque dans le plasma et, ainsi, dans le cerveau.

Dans la présente étude, les deux modèles de l'EHM montrent une augmentation de l'ammoniaque dans le plasma, ainsi que dans le cerveau. Cependant, cette augmentation n'est accompagnée par un stress nitrosatif central que chez les rats avec PCA alors qu'un stress oxydatif/nitrosatif systémique l'est chez les rats avec BDL. Ceci suggère que le stress oxydatif/nitrosatif n'est pas associé directement avec l'hyperammonémie (Tableau IV).

Tableau IV. Ammoniaque et le stress oxydatif/nitrosatif dans les deux modèles de l'EHM

	PCA		BDL	
	Plasma	Cerveau	Plasma	Cerveau
NH_4^+	↑	↑	↑	↑
SO	-	-	+	-
SN	-	+	+	-

PCA : Anastomose portocave,

BDL : Ligature de la voie biliaire,

SO : Stress oxydatif,

SN : Stress nitrosatif,

↑ : Augmentation du niveau d'ammoniaque,

+/- : Présence/absence du stress oxydatif/nitrosatif.

Insuffisance d'une hyperammoniémie modérée à induire le stress oxydatif/nitrosatif

Les deux modèles de l'EH montraient des niveaux similaires de l'ammoniaque (~135 μM), mais le résultat concernant le stress oxydatif/nitrosatif était différent chez ces deux modèles. Une des raisons de cette différence serait le niveau de l'hyperammoniémie.

Le PCA est un modèle hyperammonémique qui permet d'évaluer la neurotoxicité de l'ammoniaque. Dans la présente étude, la concentration de l'ammoniaque autour de 135 μM dans les rats avec PCA n'induit pas un stress oxydatif. Le stress oxydatif induit par l'hyperammoniémie a déjà été prouvé dans l'EH due à une insuffisance hépatique aiguë accompagnée par une hyperammoniémie sévère (1,5 mM) (Sathyaikumar et al., 2007), un traitement aiguë des astrocytes (5 mM) ou aux animaux injectés avec une concentration élevée d'ammoniaque (Hilgier et al., 2003; Kosenko et al., 2003). Ceci suggère que l'hyperammoniémie seule, et d'un niveau modéré, comme dans le cas de PCA, n'est pas capable d'induire le stress oxydatif/nitrosatif systémique.

Dépendance temporelle possible du stress oxydatif/nitrosatif

De plus, une autre possibilité est que le stress oxydatif/nitrosatif induit par l'hyperammoniémie soit fonction du temps. Il est mentionné au-dessus que certaines études ont observé une formation transitoire de ROS, et un niveau élevé initial de ROS retournant à la normale après un certain temps chez les rats intoxifiés par l'ammoniaque. Ceci suggère que le stress oxydatif/nitrosatif n'est qu'induit au début d'une hyperammoniémie, et que cette condition pathologique est réversible en fonction du temps. Étant donné que le niveau de l'ammoniaque est faible, les cellules pourraient s'adapter au changement. Ce serait le cas de nos modèles chroniques de l'EH où l'hyperammoniémie s'est développée sur une longue période chez les rats avec PCA et chez les rats avec BDL. Il est possible qu'un stress oxydatif/nitrosatif soit présent au début de l'hyperammoniémie chez ces deux modèles, cependant, cette évaluation n'a pas été réalisée chez nos rats.

Bien que notre modèle de BDL montre le même niveau d'hyperammoniémie que celui de PCA, un stress oxydatif/nitrosatif est présent dans la circulation systémique des rats avec BDL. L'élévation de l'ammoniaque n'est donc pas le seul facteur nécessaire pour développer le stress oxydatif/nitrosatif. Les résultats dans le modèle de BDL, représentant la cirrhose expérimentale, suggèrent que la dysfonction du foie peut être une cause de ce stress oxydatif/nitrosatif.

4. RELATION ENTRE L'ŒDÈME CÉRÉBRAL ET STRESS OXYDATIF/NITROSATIF

Relation indirecte entre l'œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif

L'œdème cérébral et l'hypertension intracrânienne sont les deux causes principales du décès dans l'EH due à une insuffisance hépatique aiguë. Normalement, les patients atteints de l'EH accompagnée par une cirrhose ne manifestent pas une augmentation de la pression intracrânienne (Vaquero et al., 2003). Cependant, à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique, il a été découvert que les patients atteints de l'EHM présentaient l'œdème cérébral modéré (Córdoba et al., 2001; Häussinger et al., 1994). Notre laboratoire a récemment aussi observé l'œdème cérébral chez le modèle animal de l'EHM. En effet, l'œdème cérébral a été constaté dans les rats avec BDL (Figure 10). De plus, Jover et al. (2006) ont aussi observé l'œdème cérébral dans les rats avec BDL alimentés avec une diète riche en ammoniac. Ces deux études sur les modèles de BDL ont révélé que l'œdème cérébral est impliqué dans la pathogénèse de l'EHM. Au contraire, chez notre modèle de l'encéphalopathie portosystémique (PCA), il n'a pas été noté d'œdème cérébral. Ce dernier est donc une autre caractéristique, excluant le stress oxydatif systémique, qui est différente chez les rats avec BDL par rapport aux rats avec PCA. Toutefois, la nécessité de l'accompagnement du stress oxydatif/nitrosatif avec l'hyperammoniémie afin d'induire l'œdème cérébral reste à être définie.

L'œdème cérébral est présent chez les rats avec BDL, sans que le stress oxydatif/nitrosatif ne soit démontré dans le tissu cérébral. Chez les rats avec PCA, un stress nitrosatif a été noté dans le cerveau, mais l'œdème cérébral n'est pas présent (Tableau V). Tous ces résultats suggèrent que l'œdème cérébral n'est pas induit directement ni par le stress oxydatif, ni nitrosatif.

Tableau V. Œdème cérébral et le stress oxydatif/nitrosatif dans les deux modèles de l'EHM

	PCA		BDL	
	Plasma	Cerveau	Plasma	Cerveau
OC		-		+
SO	-	-	+	-
SN	-	+	+	-

PCA : Anastomose portocave,

BDL : Ligature de voie biliaire,

OC : Œdème cérébral,

SO : Stress oxydatif;

SN : Stress nitrosatif,

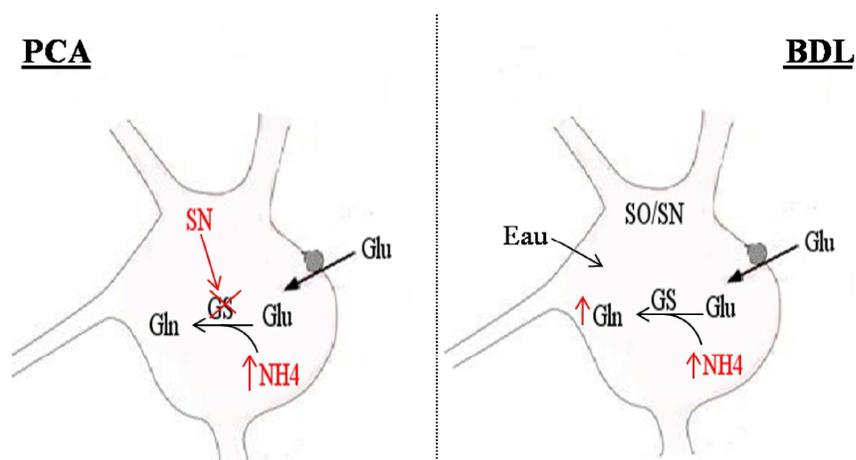
+/- : Présence/absence du stress oxydatif/nitrosatif ou de l'œdème cérébral.

Le stress oxydatif/nitrosatif protège-t-il les rats avec PCA contre l'œdème cérébral ?

Le mécanisme de l'œdème cérébral n'est pas complètement compris, cependant le gonflement des astrocytes est considéré comme une cause de l'œdème cérébral. En effet, les astrocytes sont les seules cellules cérébrales exprimant l'enzyme GS, qui permet de détoxifier l'ammoniaque dans le cerveau. Le niveau élevé d'ammoniaque entraîne une accumulation de glutamine dans les astrocytes, induisant finalement un gonflement osmotique des astrocytes (Häussinger et al., 1994). Chez les rats avec BDL, l'ammoniaque est élevée dans le cerveau, ce qui pourrait expliquer la présence de l'œdème cérébral chez ces rats atteints de cirrhose.

Pourtant, les rats avec PCA présentent aussi un niveau élevé d'ammoniaque dans le cerveau, mais l'œdème cérébral est absent. Le stress nitrosatif dans le cerveau des rats avec PCA est montré dans la présente étude. Schliess et al. (2002) ont aussi observé une augmentation de la nitration de protéines cérébrales (nitrotyrosine) dans les rats avec PCA. Parallèlement, cette étude a aussi montré une diminution de l'activité de GS due à

un niveau élevé de la nitrotyrosine dans cette protéine chez les rats avec PCA. De plus, une activation réduite de 32% de GS dans le cortex a été observée chez les rats avec PCA (Desjardins et al., 1999). Toutes ces données indiquent que l'activité de GS dans le cerveau est diminuée chez les rats avec PCA, et que cette diminution pourrait être l'origine d'une nitration (S-nitrosylation ou nitrotyrosine) de cette enzyme. Le gonflement des astrocytes est dû à l'action de GS qui élimine l'ammoniaque excessive, cela entraîne par la suite une production intracellulaire excessive de glutamine. Une modification de GS mène donc à une diminution de la production de la glutamine, ce qui protège les astrocytes contre le gonflement et ainsi contre l'œdème cérébral (Figure 33).



PCA : Anastomose portocave,
 BDL : Ligature de voie biliaire,
 SO : Stress oxydatif;
 SN : Stress nitrosatif,
 ↑ : Augmentation du niveau de l'ammoniaque/de glutamine,
 Glu : Glutamate;
 Gln : Glutamine;
 GS : Glutamine synthétase.

Figure 33. Rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans l'œdème cérébral chez les rats avec PCA et BDL

L'œdème cérébral était présent chez les rats avec BDL, mais pas chez les rats avec PCA. Le stress nitrosatif présent dans le cerveau des rats avec PCA induit l'altération de GS, ce qui protège les astrocytes contre le gonflement des astrocytes et ainsi contre l'œdème cérébral.

5. ACTION SYNERGIQUE ENTRE L'HYPERAMMONIÉMIE ET LE STRESS OXYDATIF/NITROSATIF

Il a déjà été prouvé que l'ammoniaque était le facteur central dans la pathogénèse de l'EH. La présente étude montre une hyperammoniémie chez les deux modèles de l'EHM. Les rats avec PCA et avec BDL présentent tous deux le même niveau d'hyperammoniémie ainsi qu'un niveau élevé d'ammoniaque dans le cerveau, cependant l'œdème cérébral est observé que chez les rats avec BDL (Figure 9). Ceci suggère que l'hyperammoniémie seule n'induit pas l'œdème cérébral et que d'autres facteurs tels le stress oxydatif/nitrosatif sont impliqués dans cette condition pathologique.

La relation entre le stress oxydatif/nitrosatif systémique et l'œdème cérébral chez les rats avec BDL est inconnue. Le stress oxydatif/nitrosatif systémique est-il la seule condition nécessaire pour induire l'œdème cérébral ou une action synergique du stress oxydatif/nitrosatif systémique et l'hyperammoniémie serait impliquée? De plus, c'est le stress oxydatif/nitrosatif systémique et non central qui est présent chez les rats avec BDL, ce qui suggère que l'œdème cérébral n'est pas associé directement avec le stress oxydatif/nitrosatif central.

6. PERSPECTIVES

Dans ce projet, la relation entre l'hyperammoniémie, le stress oxydatif/nitrosatif et l'œdème cérébral a été investiguée dans les deux modèles animaux chroniques de l'EH.

Dans le cas de BDL, l'explication précise de la présence du stress oxydatif/nitrosatif systémique chez les rats avec BDL n'est pas claire. Bien qu'une augmentation de ROS soit notée chez les rats avec BDL, les causes de cette augmentation sont toujours inconnues. Une diminution de défense (antioxydants) ou une production excessive de ROS dépassant la capacité du système antioxydant resteraient à être déterminés chez les rats avec BDL. Aussi, les raisons pour lesquelles le stress oxydatif/nitrosatif est présent seulement dans le sang, mais pas dans le cerveau des rats avec BDL sont inconnues. Le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique pourrait donc être étudié afin d'expliquer ce phénomène.

Les deux modèles de l'EHM présentent des résultats différents, particulièrement, l'œdème cérébral qui n'a été observé que chez les rats avec BDL. Un futur projet pourrait être réalisé afin de trouver les raisons de cette différence entre les deux modèles. Pour ce faire, il serait important de caractériser en parallèle le comportement des rats avec BDL et PCA afin de vérifier si un type d'EH est plus sévère que l'autre. En plus, une hypothèse mentionnée dans la présente étude est que le stress nitrosatif altérerait l'activité de GS, permettant de protéger les astrocytes contre l'œdème cérébral (cas de PCA). La présence d'œdème cérébral en inhibant chimiquement la GS chez les rats avec BDL pourrait donc être évaluée pour prouver cette hypothèse.

Le stress oxydatif/nitrosatif systémique n'a pas été induit par l'hyperammoniémie chez les rats avec PCA, cela pourrait être explicable par la chronicité de l'hyperammoniémie. Plusieurs études ont rapporté que le stress oxydatif a été induit par un niveau élevé d'ammoniaque dans les modèles aigus de l'EH ou par une injection aiguë d'ammoniaque aux animaux. Il est possible qu'au début de l'hyperammoniémie le stress oxydatif/nitrosatif systémique soit induit et que ce stress

soit transitoire et temporel. Un projet futur pourrait être éclairci la relation entre le stress oxydatif/nitrosatif et l'ammoniaque (en fonction du temps et/ou de la concentration).

Certes, d'autres facteurs impliqués dans l'EH tels les cytokines ou l'inflammation pourrait aussi être une direction pour l'investigation détaillée de la pathogénèse de l'œdème cérébral dans l'EH chronique.

7. RÉSUMÉ

Dans l'ensemble, le mécanisme pathologique de l'EH est complexe. L'ammoniaque est la cause centrale, malgré que le stress oxydatif/nitrosatif soit aussi un facteur dans ce syndrome neuropsychiatrique. Cependant, une hyperammoniémie modérée présente dans l'EH minimale n'a pas démontrée une association directe avec le stress oxydatif/nitrosatif dans la circulation systémique, ni dans le cerveau. Les résultats montrent que l'hyperammoniémie seule n'induit pas le stress oxydatif/nitrosatif ou l'œdème cérébral, et qu'une action synergique entre l'ammoniaque et le stress oxydatif systémique est responsable d'une augmentation de l'eau dans le cerveau.

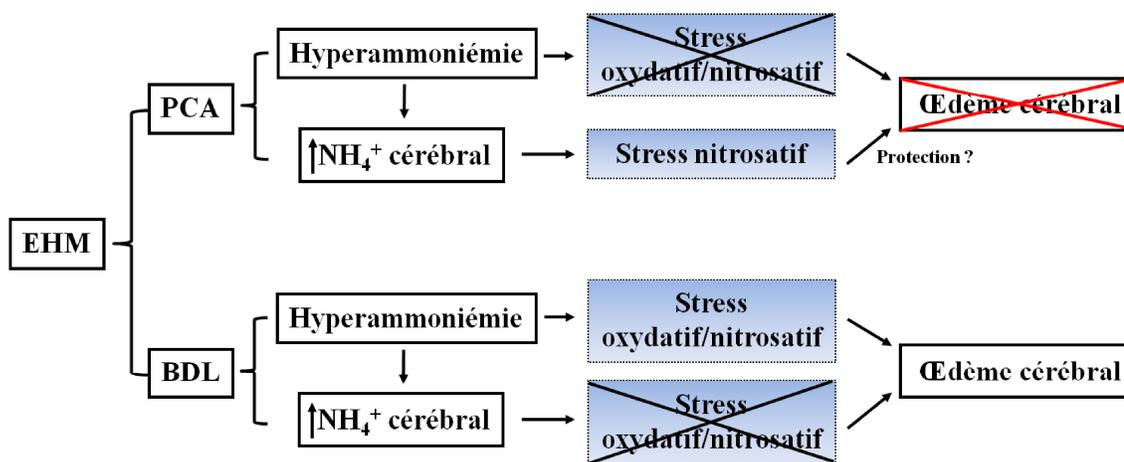


Figure 34. Résumé de deux modèles de l'EHM

Les deux modèles de l'EHM, les rats avec PCA et BDL ont une hyperammoniémie similaire. Cependant, cette hyperammoniémie modérée n'a pas été accompagnée par le même statut de stress oxydatif/nitrosatif. Ceci suggère qu'une action synergique entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif/nitrosatif est responsable de l'œdème cérébral.

RÉFÉRENCES

Ahboucha, S. and Butterworth, R.F. (2004). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metab Brain Dis* 19: 331-343.

Ahboucha, S., Jiang, W., Chatauret, N., Mamer, O., Baker, G.B. and Butterworth, R.F. (2008). Indomethacin improves locomotor deficit and reduces brain concentrations of neuroinhibitory steroids in rats following portacaval anastomosis. *Neurogastroenterol. Motil.* 20: 949-957.

Ahl, B., Weissenborn, K., van den Hoff, J., Fischer-Wasels, D., Köstler, H., Hecker, H. and Burchert, W. (2004). Regional differences in cerebral blood flow and cerebral ammonia metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology* 40: 73-79.

Akahoshi, T., Nishizaki, T., Wakasugi, K., Mastuzaka, T., Kume, K., Yamamoto, I. and Sugimachi, K. (2000). Portal-systemic encephalopathy due to a congenital extrahepatic portosystemic shunt: three cases and literature review. *Hepatogastroenterology* 47: 1113-1116.

Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Carney, J.M. and Butterfield, D.A. (1997). Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloid beta peptide. *Free Radic. Res.* 27: 267-281.

Albrecht, J. and Jones, E.A. (1999). Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J. Neurol. Sci.* 170: 138-146.

Albrecht, J. and Norenberg, M.D. (2006). Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44: 788-794.

Ali, S., Stolpen, A.H. and Schmidt, W.N. (2009). Portosystemic Encephalopathy due to Mesoiliac Shunt in a Patient Without Cirrhosis. *J. Clin. Gastroenterol.* (sous presse)

Aller, M., García-Fernández, M., Sánchez-Patán, F., Santín, L., Rioja, J., Anchuelo, R., Arias, J. and Arias, J. (2008). Plasma redox status is impaired in the portacaval shunted rat - the risk of the reduced antioxidant ability. *Comp Hepatol.* 7: 1.

Amodio, P., Del Piccolo, F., Pettenò, E., Mapelli, D., Angeli, P., Iemmolo, R., Muraca, M., Musto, C., Gerunda, G., Rizzo, C., et al. (2001). Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *J. Hepatol.* 35: 37-45.

Amodio, P., Montagnese, S., Gatta, A. and Morgan, M.Y. (2004). Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 253-267.

Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10 Suppl: S18-25.

Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 227-238.

Apelqvist, G., Bergqvist, P.B., Larsson, B., Bugge, M. and Bengtsson, F. (1998). Regional brain serotonin receptor changes in portacaval shunted rats. *Acta Physiol. Scand.* 162: 509-516.

Apelqvist, G., Hindfelt, B., Andersson, G. and Bengtsson, F. (1999). Altered adaptive behaviour expressed in an open-field paradigm in experimental hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 106: 165-173.

Arria, A.M., Tarter, R.E., Starzl, T.E. and Van Thiel, D.H. (1991). Improvement in cognitive functioning of alcoholics following orthotopic liver transplantation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 956-962.

Assimakopoulos, S.F. and Vagianos, C.E. (2009). Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J. Gastroenterol.* 15: 121-123.

Astore, D. and Boicelli, C.A. (2000). Hyperammonemia and chronic hepatic encephalopathy: an in vivo PMRS study of the rat brain. *MAGMA* 10: 160-166.

Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1998). Portacaval anastomosis results in more widespread alterations of cerebral metabolism in old versus young adult rats: implications for post-shunt encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13: 69-78.

Bahn, E., Nolte, W., Kurth, C., Ramadori, G., R  ther, E. and Wiltfang, J. (2002). Quantification of the electroencephalographic theta/alpha ratio for the assessment of portal-systemic encephalopathy following implantation of transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPSS). *Metab Brain Dis* 17: 19-28.

Bajaj, J.S. (2008). Minimal hepatic encephalopathy matters in daily life. *World J. Gastroenterol.* 14: 3609-3615.

Bajaj, J.S., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R.R., Hoffmann, R.G., Knox, J.F., Hirschke, D., Hammeke, T.A., Pinkerton, S.D. and Saeian, K. (2008). Inhibitory control test for the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 135: 1591-1600.

Bajaj, J.S., Saeian, K., Schubert, C.M., Hafeezullah, M., Franco, J., Varma, R.R., Gibson, D.P., Hoffmann, R.G., Stravitz, R.T., Heuman, D.M., et al. (2009). Minimal hepatic encephalopathy is associated with motor vehicle crashes: the reality beyond the driving test. *Hepatology* 50: 1175-1183.

Bengtsson, F., Nobin, A., Falck, B., Gage, F.H. and Jeppsson, B. (1986). Portacaval shunt in the rat: selective alterations in behavior and brain serotonin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1611-1616.

Bergeron, M., Swain, M.S., Reader, T.A., Grondin, L. and Butterworth, R.F. (1990). Effect of ammonia on brain serotonin metabolism in relation to function in the portacaval shunted rat. *J. Neurochem.* 55: 222-229.

Bermejo, P., Martín-Aragón, S., Benedí, J., Susín, C., Felici, E., Gil, P., Ribera, J.M. and Villar, A.M. (2008). Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic. Res.* 42: 162-170.

Blei, A.T. and Córdoba, J and Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. (2001). Hepatic Encephalopathy. *Am J Gastroenterol.* 96: 1968-1976.

Bonnefont-Rousselot, D., Lacomblez, L., Jaudon, M., Lepage, S., Salachas, F., Bensimon, G., Bizard, C., Doppler, V., Delattre, J. and Meininger, V. (2000). Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 178: 57-62.

Bosoi, C.R. and Rose, C.F. (2009). Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* 24: 95-102.

Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H.J. and Beal, M.F. (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 61: 2322-2325.

Bromberg, P.A., Robin, E.D. and Forkner, C.E.J. (1960). The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH_4 plus minus NH_3 system. *J. Clin. Invest.* 39: 332-341.

Brown, R.H.J. and Robberecht, W. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Semin Neurol* 21: 131-139.

Bruck, R., Aeed, H., Shirin, H., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y. and Halpern, Z. (1999). The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 31: 27-38.

Bustamante, J., Rimola, A., Ventura, P.J., Navasa, M., Cirera, I. and Reggiardo, V and Rodés, J (1999). Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* 30: 890-895.

Butterworth, R.F. (2002). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 17: 221-227.

Butterworth, R.F. (2003). Hepatic encephalopathy. *Alcohol Res Health* 27: 240-246.

Butterworth, R.F. (2003). Hepatic encephalopathy-a serious complication of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 27: 143-145.

Butterworth, R.F. and Giguère, J.F. (1986). Cerebral aminoacids in portal-systemic encephalopathy: lack of evidence for altered gamma-aminobutyric acid (GABA) function. *Metab Brain Dis* 1: 221-228.

Butterworth, R.F., Girard, G. and Giguère, J.F. (1988). Regional differences in the capacity for ammonia removal by brain following portocaval anastomosis. *J. Neurochem.* 51: 486-490.

Butterworth, R.F., Norenberg, M.D., Felipo, V., Ferenci, P., Albrecht, J., Blei, A.T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int.* 29: 783-788.

Cauli, O., Llansola, M., Erceg, S. and Felipo, V. (2006). Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J. Hepatol.* 45: 654-661.

Chan, C., Huang, S., Wang, T., Lu, R., Lee, F., Chang, F., Chu, C., Chen, Y., Chan, C., Huang, H., et al. (2004). Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* 34: 122-128.

Chen, Y., Chen, C., Pfeiffer, D.R. and Zweier, J.L. (2007). Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 282: 32640-32654.

Chen, Y., Chu, H., Pan, K., Teng, C., Wang, D., Wang, A.H., Khoo, K. and Meng, T. (2008). Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J. Biol. Chem.* 283: 35265-35272.

Chung, K.K.K. (2006-2007). Say NO to neurodegeneration: role of S-nitrosylation in neurodegenerative disorders. *Neurosignals* 15: 307-313.

Clemmesen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A. and Ott, P. (1999). Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29: 648-653.

Commoner, B., Townsend, J. and Pake, G.E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691.

Cooper, A.J. and Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67: 440-519.

Cordoba, J. and Blei, A.T. (1996). Brain edema and hepatic encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* 16: 271-280.

Córdoba, J., Alonso, J., Rovira, A., Jacas, C., Sanpedro, F., Castells, L., Vargas, V., Margarit, C., Kulisevsky, J., Esteban, R., et al. (2001). The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J. Hepatol.* 35: 598-604.

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 389-406.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52: 601-623.

Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, Quevedo J, and Streck EL. (2010). *Neurochem Res.* 35: 1-12.

Dawson, T.M. and Snyder, S.H. (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14: 5147-5159.

Dbouk, N. and McGuire, B.M. (2006). Hepatic encephalopathy: a review of its pathophysiology and treatment. *Curr Treat Options Gastroenterol* 9: 464-474.

Del Rio, D., Stewart, A.J. and Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15: 316-328.

Delibas, N., Ozcankaya, R. and Altuntas, I. (2002). Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. *Clin. Biochem.* 35: 137-141.

Desjardins, P., Rao, K.V., Michalak, A., Rose, C. and Butterworth, R.F. (1999). Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis* 14: 273-280.

Dhiman, R.K. and Chawla, Y.K. (2009). Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 28: 5-16.

Di Domenico, F., Cenini, G., Sultana, R., Perluigi, M., Uberti, D., Memo, M. and Butterfield, D.A. (2009). Glutathionylation of the pro-apoptotic protein p53 in Alzheimer's disease brain: implications for AD pathogenesis. *Neurochem. Res.* 34: 727-733.

Duda, J.E., Giasson, B.I., Chen, Q., Gur, T.L., Hurtig, H.I., Stern, M.B., Gollomp, S.M., Ischiropoulos, H., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2000). Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am. J. Pathol.* 157: 1439-1445.

Dunn, C.W., Horton, J.W., Megison, S.M. and Vuitch, M.F. (1991). Contribution of portal systemic shunt to Kupffer cell dysfunction in obstructive jaundice. *J. Surg. Res.* 50: 234-239.

Erceg, S., Monfort, P., Hernández-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C. and Felipo, V. (2005). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology* 41: 299-306.

Eroglu, Y. and Byrne, W.J. (2009). Hepatic encephalopathy. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 27: 401-414.

Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81-128.

Felipo, V. and Butterworth, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67: 259-279.

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R. and Weissenborn, Karin and Blei, Andres T (2002). Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35: 716-721.

Floor, E. and Wetzel, M.G. (1998). Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.* 70: 268-275.

Foster, M.W., McMahon, T.J. and Stamler, J.S. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9: 160-168.

Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P. and Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science.* 119: 623-626.

Giguère, J.F. and Butterworth, R.F. (1984). Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 9: 1309-1321.

Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Colombo, R. and Dalle-Donne, I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 8: 201-212.

Gow, A.J., Chen, Q., Hess, D.T., Day, B.J., Ischiropoulos, H. and Stamler, J.S. (2002). Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J. Biol. Chem.* 277: 9637-9640.

Gracia-Sancho, J., Laviña, B., Rodríguez-Vilarrupla, A., García-Calderó, H., Fernández, M., Bosch, J. and García-Pagán, J. (2008). Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 47: 1248-1256.

Greve, J.W., Gouma, D.J., Soeters, P.B. and Burman, W.A. (1990). Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. *Gastroenterology* 98: 478-485.

Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-bot, M.L., Hop, W.C. and Schalm, S.W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 28: 45-49.

Guerrini, V.H. (1994). Effect of antioxidants on ammonia induced CNS-renal pathobiology in sheep. *Free Radic. Res.* 21: 35-43.

Görg, B., Qvarthava, N., Keitel, V., Bidmon, H.J., Selbach, O., Schliess, F. and Häussinger, D. (2008). Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48: 567-579.

Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19.

Hazell, A.S. and Butterworth, R.F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 99-112.

Hilgier, W., Anderzhanova, E., Oja, S.S., Saransaari, P. and Albrecht, J. (2003). Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 468: 21-25.

Horiguchi, T., Uryu, K., Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lightfoot, R., Bellmann, C., Richter-Landsberg, C., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2003). Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am. J. Pathol.* 163: 1021-1031.

Huang, L., Chen, C., Sheen, J., Chen, Y., Hsieh, C. and Tain, Y. (2010). The Interaction between High Ammonia Diet and Bile Duct Ligation in Developing Rats: Assessment by Spatial Memory and Asymmetric Dimethylarginine. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28: 169-174.

Häussinger, D. (2006). Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43: 1187-1190.

Häussinger, D. and Schliess, F. (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57: 1156-1165.

Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F. and vom Dahl, S. (2000). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* 32: 1035-1038.

Häussinger, D., Laubenberger, J., vom Dahl, S., Ernst, T., Bayer, S., Langer, M., Gerok, W. and Hennig, J. (1994). Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 107: 1475-1480.

Jayakumar, A.R., Liu, M., Moriyama, M., Ramakrishnan, R., Forbush, B.3., Reddy, P.V.B. and Norenberg, M.D. (2008). Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J. Biol. Chem.* 283: 33874-33882.

Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3: S26-36; discussion S36-8.

Ji, C., Rouzer, C.A., Marnett, L.J. and Pietenpol, J.A. (1998). Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis* 19: 1275-1283.

Jover, R., Madaria, E., Felipo, V., Rodrigo, R., Candela, A. and Compañ, A. (2005). Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metab Brain Dis* 20: 399-408.

Jover, R., Rodrigo, R., Felipo, V., Insausti, R., Sáez-Valero, J., García-Ayllón, M.S., Suárez, I., Candela, A., Compañ, A., Esteban, A., et al. (2006). Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43: 1257-1266.

Kharbanda, P.S., Saraswat, V.A. and Dhiman, R.K. (2003). Minimal hepatic encephalopathy: diagnosis by neuropsychological and neurophysiologic methods. *Indian J Gastroenterol* 22 Suppl 2: S37-41.

Kircheis, G., Wettstein, M., Dahl, S.V. and Häussinger, D. (2002). Clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 17: 453-462.

Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M.D., Grisolia, S. and Felipo, V. (1995). Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem. Res.* 20: 451-456.

Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C. and Felipo, V. (2003). Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res.* 981: 193-200.

Kountouras, J., Billing, B.H. and Scheuer, P.J. (1984). Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65: 305-311.

Kramer, L., Tribl, B., Gendo, A., Zauner, C., Schneider, B., Ferenci, P. and Madl, C. (2000). Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. *Hepatology* 31: 30-34.

Kugler, P. and Drenckhahn, D. (1996). Astrocytes and Bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. *Glia* 16: 165-173.

Lauderback, C.M., Hackett, J.M., Huang, F.F., Keller, J.N., Szweda, L.I., Markesbery, W.R. and Butterfield, D.A. (2001). The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J. Neurochem.* 78: 413-416.

Lee, S.H. and Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50: 668-672.

Lefton, H.B., Rosa, A. and Cohen, M. (2009). Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med. Clin. North Am.* 93: 787-99, vii.

Levine, R.L. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* 258: 11823-11827.

Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.

Lockwood, A.H. (2004). Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 345-349.

Lockwood, A.H., Ginsberg, M.D., Rhoades, H.M. and Gutierrez, M.T. (1986). Cerebral glucose metabolism after portacaval shunting in the rat. Patterns of metabolism and implications for the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *J. Clin. Invest.* 78: 86-95.

Lockwood, A.H., McDonald, J.M., Reiman, R.E., Gelbard, A.S., Laughlin, J.S., Duffy, T.E. and Plum, F. (1979). The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia. *J. Clin. Invest.* 63: 449-460.

Lockwood, A.H., Yap, E.W. and Wong, W.H. (1991). Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 337-341.

Lodi, R., Tonon, C., Stracciari, A., Weiger, M., Camaggi, V., Iotti, S., Donati, G., Guarino, M., Bolondi, L. and Barbiroli, B. (2004). Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology* 62: 762-766.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin. Chim. Acta* 380: 50-58.

Massaad, C.A., Washington, T.M., Pautler, R.G. and Klann, E. (2009). Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 13576-13581.

Matsumoto, Y., Niimoto, S., Katayama, K., Hirose, K., Yamaguchi, A. and Torigoe, K. (2002). Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9: 360-366.

McNaught, K.S., Olanow, C.W., Halliwell, B., Isacson, O. and Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 589-594.

Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J. and Thérond, P. (2008). [Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 66: 605-620.

Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A. and Shelton, M.D. (2008). Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 1941-1988.

Monfort, P., Erceg, S., Piedrafita, B., Llansola, M. and Felipo, V. (2007). Chronic liver failure in rats impairs glutamatergic synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampus and learning ability. *Eur. J. Neurosci.* 25: 2103-2111.

Monfort, P., Muñoz, M., ElAyadi, A. and Kosenko, Elena & Felipo, Vicente (2002). Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis* 17: 237-250.

Moro, M.A., De Alba, J., Leza, J.C., Lorenzo, P., Fernández, A.P., Bentura, M.L., Bosca, L., Rodrigo, J. and Lizasoain, I. (1998). Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* 10: 445-456.

Murphy, S., Simmons, M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc-Golomb, D. and Schwartz, J.P. (1993). Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16: 323-328.

Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J., Cimadevilla, J.M. and Arias, J.L. (2008). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res.* 188: 32-40.

Nakamura, T. and Lipton, S.A. (2009). Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis* 14: 455-468.

Newcombe, J., Li, H. and Cuzner, M.L. (1994). Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: implications for pathogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20: 152-162.

Newman, S.F., Sultana, R., Perluigi, M., Coccia, R., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Turner, D.M. and Butterfield, D.A. (2007). An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *J. Neurosci. Res.* 85: 1506-1514.

Nobili, V., Pastore, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., Comparcola, D., Sartorelli, M.R., Marcellini, M., Bertini, E. and Piemonte, F. (2005). Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Chim. Acta* 355: 105-111.

Nordberg, J. and Arnér, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1287-1312.

Norenberg, M.D. (1998). Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13: 319-335.

Norenberg, M.D., Baker, L., Norenberg, L.O., Blicharska, J., Bruce-Gregorios, J.H. and Neary, J.T. (1991). Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture. *Neurochem. Res.* 16: 833-836.

Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R. and Rama Rao, K.V. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 313-329.

Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V. and Panickar, K.S. (2007). New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 22: 219-234.

Norenberg, M.D., Rama Rao, K.V. and Jayakumar, A.R. (2009). Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 24: 103-117.

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24: 1311-1317.

Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K. and Uchida, K. (1999). 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J. Biol. Chem.* 274: 23787-23793.

Ong, J.P., Aggarwal, A., Krieger, D., Easley, K.A., Karafa, M.T., Lente, F.V. and Arroliga, Alejandro C & Mullen, Kevin D (2003). Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med.* 114: 188-193.

Oria, M., Ragner, N., Chatauret, N., Bartolí, R., Odena, G., Planas, R. and Córdoba, J. (2006). Functional abnormalities of the motor tract in the rat after portocaval anastomosis and after carbon tetrachloride induction of cirrhosis. *Metab Brain Dis* 21: 297-308.

Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87: 315-424.

Pedersen, W.A., Fu, W., Keller, J.N., Markesbery, W.R., Appel, S., Smith, R.G., Kasarskis, E. and Mattson, M.P. (1998). Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 44: 819-824.

Pedretti, G., Calzetti, C., Missale, G. and Fiaccadori, F. (1991). Rifaximin versus neomycin on hyperammonemia in chronic portal systemic encephalopathy of cirrhotics. A double-blind, randomized trial. *Ital J Gastroenterol* 23: 175-178.

Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. and Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1499-1503.

Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G. and Butterfield, D.A. (2004). Free radicals and brain aging. *Clin. Geriatr. Med.* 20: 329-359.

Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G. and Butterfield, D.A. (2004). Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59: 478-493.

Poordad, F.F. (2007). Review article: the burden of hepatic encephalopathy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25 Suppl 1: 3-9.

Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A. and Agarwal, R. (2007). Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45: 549-559.

Rao, V.L., Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1995). Increased nitric oxide synthase activities and L-[3H]arginine uptake in brain following portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* 65: 677-678.

Rao, V.L., Audet, R.M. and Butterworth, R.F. (1997). Increased neuronal nitric oxide synthase expression in brain following portacaval anastomosis. *Brain Res.* 765: 169-172.

Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K. and Reddanna, P. (2004). Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* 368: 15-20.

Reed, T.T., Pierce, W.M., Markesbery, W.R. and Butterfield, D.A. (2009). Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res.* 1274: 66-76.

Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. and Stadtman, E.R. (2001). Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 69-74.

Riggio, O., Efrati, C., Catalano, C., Pediconi, F., Mecarelli, O., Accornero, N., Nicolao, F., Angeloni, S., Masini, A., Ridola, L., et al. (2005). High prevalence of spontaneous portal-systemic shunts in persistent hepatic encephalopathy: a case-control study. *Hepatology* 42: 1158-1165.

Rikkers, L., Jenko, P., Rudman, D. and Freides, D. (1978). Subclinical hepatic encephalopathy: detection, prevalence, and relationship to nitrogen metabolism. *Gastroenterology* 75: 462-469.

Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compañ, A., Sáez-Valero, J., Erceg, S. and Felipo, V. (2005). Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience* 130: 435-443.

Romero-Gómez, M., Jover, M., Galán, J.J. and Ruiz, A. (2009). Gut ammonia production and its modulation. *Metab Brain Dis* 24: 147-157.

Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.M. and Pomier-Layrargues, G. (1999). Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117: 640-644.

Rose, C., Michalak, A., Rao, K.V., Quack, G., Kircheis, G. and Butterworth, R.F. (1999). L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology* 30: 636-640.

Salter, M., Knowles, R.G. and Moncada, S. (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 291: 145-149.

Sathyaikumar, K.V., Swapna, I., Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K., Dutta Gupta, A., Senthilkumaran, B. and Reddanna, P. (2007). Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem. Res.* 32: 517-524.

Saxena, N., Bhatia, M., Joshi, Y.K., Garg, P.K. and Tandon, R.K. (2001). Auditory P300 event-related potentials and number connection test for evaluation of subclinical hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis of the liver: a follow-up study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16: 322-327.

Saxena, N., Bhatia, M., Joshi, Y.K., Garg, P.K., Dwivedi, S.N. and Tandon, R.K. (2002). Electrophysiological and neuropsychological tests for the diagnosis of

subclinical hepatic encephalopathy and prediction of overt encephalopathy. *Liver* 22: 190-197.

Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H.J., Herrmann, A., Butterworth, R.F., Zilles, K. and Häussinger, D. (2002). Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* 16: 739-741.

Schneider, C., Porter, N.A. and Brash, A.R. (2008). Routes to 4-hydroxynonenal: fundamental issues in the mechanisms of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 283: 15539-15543.

Schomerus, H. and Hamster, W. (1998). Neuropsychological aspects of portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13: 361-377.

Schomerus, H. and Hamster, W. (2001). Quality of life in cirrhotics with minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 16: 37-41.

Schonhoff, C.M., Matsuoka, M., Tummala, H., Johnson, M.A., Estevéz, A.G., Wu, R., Kamaid, A., Ricart, K.C., Hashimoto, Y., Gaston, B., et al. (2006). S-nitrosothiol depletion in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 2404-2409.

Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J. and Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267: 4904-4911.

Scorticati, C., Prestifilippo, J.P., Eizayaga, F.X., Castro, J.L., Romay, S., Fernández, M.A. and Lemberg, Abraham and Perazzo, Juan C (2004). Hyperammonemia, brain edema and blood-brain barrier alterations in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication. *World J Gastroenterol.* 10: 1321-1324.

Sergeeva, O.A., Schulz, D., Doreulee, N., Ponomarenko, A.A., Selbach, O., Borsch, E., Kircheis, G., Huston, J.P., Häussinger, D. and Haas, H.L. (2005). Deficits in corticostriatal synaptic plasticity and behavioral habituation in rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience* 134: 1091-1098.

Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ and Nagano T. (2003). Development of Novel Fluorescence Probes that can reliably detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. *J Biol Chem* 278: 3170-3175.

Sharma, A., Kaur, P., Kumar, B., Prabhakar, S. and Gill, K.D. (2008). Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. *Parkinsonism Relat. Disord.* 14: 52-57.

Sharma, P., Sharma, B.C., Puri, V. and Sarin, S.K. (2008). Minimal hepatic encephalopathy in patients with extrahepatic portal vein obstruction. *Am. J. Gastroenterol.* 103: 1406-1412.

Shawcross, D. and Jalan, R. (2005). Dispelling myths in the treatment of hepatic encephalopathy. *Lancet* 365: 431-433.

Shringarpure, R., Grune, T., Sitte, N. and Davies, K.J. (2000). 4-Hydroxynonenal-modified amyloid-beta peptide inhibits the proteasome: possible importance in Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1802-1809.

Siems, W.G., Hapner, S.J. and van Kuijk, F.J. (1996). 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 215-223.

Simpson, E.P., Henry, Y.K., Henkel, J.S., Smith, R.G. and Appel, S.H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 62: 1758-1765.

Smith, M.A., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Harris, P.L., Beal, M.F., Kowall, N. and Perry, G. (1998). Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 731-735.

Sokol, R.J., Devereaux, M., Dahl, R. and Gumpricht, E. (2006). "Let there be bile"--understanding hepatic injury in cholestasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 43 Suppl 1: S4-9.

Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J. and Cabisco, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic. Biol. Med.* 45: 667-678.

Stadtman, E.R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 40: 1250-1258.

Stadtman, E.R. and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218.

Stewart, C.A. and Cerhan, J. (2005). Hepatic encephalopathy: a dynamic or static condition. *Metab Brain Dis* 20: 193-204.

Stewart, C.A. and Smith, G.E. (2007). Minimal hepatic encephalopathy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 4: 677-685.

Stewart, V.C. and Heales, S.J.R. (2003). Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 287-303.

Suárez, I., Bodega, G., Rubio, M. and Fernández, B. (2009). Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 24: 395-408.

Takahashi, H., Koehler, R.C., Brusilow, S.W. and Traystman, R.J. (1991). Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am. J. Physiol.* 261: H825-9.

Theander, B., Apelqvist, G., Bugge, M., Andersson, G., Hindfelt, B. and Bengtsson, F. (1997). Gender and diurnal effects on specific open-field behavioral patterns in the portacaval shunted rat. *Metab Brain Dis* 12: 47-59.

Torre Delgadillo, A., Guerrero-Hernández, I. and Uribe, M. (2006). [Minimal hepatic encephalopathy: characteristics, diagnosis and clinical implications]. *Rev Gastroenterol Mex* 71: 63-70.

Townsend, D.M., Manevich, Y., He, L., Xiong, Y., Bowers, R.R.J., Hutchens, S. and Tew, K.D. (2009). Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res.* 69: 7626-7634.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.

Van der Vliet, A. and Bast, A. (1992). Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem. Biol. Interact.* 85: 95-116.

Vaquero, J., Chung, C., Cahill, M.E. and Blei, A.T. (2003). Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin. Liver Dis.* 23: 259-269.

Warskulat, U., Görg, B., Bidmon, H., Müller, H.W., Schliess, F. and Häussinger, D. (2002). Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 40: 324-336.

Weissenborn, K., Ahl, B., Fischer-Wasels, D., van den Hoff, J., Hecker, H., Burchert, W. and Köstler, H. (2007). Correlations between magnetic resonance spectroscopy alterations and cerebral ammonia and glucose metabolism in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *Gut* 56: 1736-1742.

Weissenborn, K., Heidenreich, S., Ennen, J., Rückert, N. and Hecker, H. (2001). Attention deficits in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 16: 13-19.

Widmer, R., Kaiser, B., Engels, M., Jung, T. and Grune, T. (2007). Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondria-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 464: 1-11.

Williams, T.I., Lynn, B.C., Markesbery, W.R. and Lovell, M.A. (2006). Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain

in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27: 1094-1099.

Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37: 1-17.

Yan, L. (2009). Analysis of oxidative modification of proteins. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 14: Unit14.4.

Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L.A., Rockenstein, E.M., Zhang, Z., Masliah, E., et al. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 10810-10814.

Yeo, W., Lee, S.J., Lee, J.R. and Kim, K.P. (2008). Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Rep* 41: 194-203.

Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R. and Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2696-2701.

Ytrebø, L.M., Kristiansen, R.G., Maehre, H., Fuskevåg, O.M., Kalstad, T., Revhaug, A., Cobos, M.J., Jalan, R. and Rose, C.F. (2009). L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology* 50: 165-174.

Zarkovic, N. (2003). 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.* 24: 281-291.

Zeegen, R., Drinkwater, J.E. and Dawson, A.M. (1970). Method for measuring cerebral dysfunction in patients with liver disease. *Br Med J* 2: 633-636.

Zuwała-Jagiello, J., Pazgan-Simon, M., Simon, K. and Warwas, M. (2009). Elevated advanced oxidation protein products levels in patients with liver cirrhosis. *Acta Biochim. Pol.* 56: 679-685.

ANNEXE

Article

Portacaval anastomosis-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress

Yang X, Bosoi CR, Jiang W, Tremblay M, and Rose CF.

Metab Brain Dis (2010) 25:11-15

Neuroscience Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

(Hôpital Saint-Luc), Montréal, Québec, Canada H2X 3J4

Running head: Oxidative stress in minimal hepatic encephalopathy

Key Words: Hepatic encephalopathy, PCA, Oxidative stress, Hyperammonemia

Address for reprints and correspondence:

Christopher F. Rose, Ph.D

Neuroscience Research Unit

CHUM / Hôpital Saint-Luc / 1058 St-Denis Street

Montreal, Quebec / H2X 3J4 Canada

Tel.: (514) 890-8000 ext. 35739

FAX: (514) 412-7253

ABSTRACT

Ammonia is neurotoxic and believed to play a major role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE). It has been demonstrated, *in vitro* or *in vivo*, that acute and high ammonia treatment induces oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive and can lead to oxidization of proteins resulting in protein damage. The present study was aimed to assess oxidative status of proteins in plasma and brain (frontal cortex) of rats with 4-week portacaval anastomosis (PCA). Markers of oxidative stress, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and carbonylation were evaluated by immunoblotting in plasma and frontal cortex. Western blot analysis did not demonstrate a significant difference in either HNE-linked or carbonyl derivatives on proteins between PCA and sham-operated control rats in both plasma and frontal cortex. The present study suggests PCA-induced hyperammonemia does not lead to systemic or central oxidative stress.

INTRODUCTION

The brain relies on a healthy liver to detoxify circulating toxins which are capable of entering the brain and leading to functional impairment and hepatic encephalopathy (HE) (Butterworth, 2003). HE is characterized with a spectrum of symptoms ranging from personality and mood changes, night-time sleep disturbance, alterations in concentration and attention, severe cognitive effects, coma and death (Hazell and Butterworth, 1999). The pathogenesis of HE is complex, involving a number of possible toxic and neurotransmitter substances on the brain associated with a background of astrocytic pathology (Blendis, 2006). Liver failure or disease reduces the capacity of the liver to remove neurotoxic substances such as ammonia, a key factor involved in the pathogenesis of HE (Bosoi and Rose, 2009; Butterworth, 2003).

The brain is susceptible to oxidative stress due to its high content of unsaturated fatty acids, high oxygen consumption, high levels of free radicals and relatively low levels antioxidant defence systems (Choi and Yu, 1995; Poon et al., 2004). Brain tissue or cells are constantly exposed to diverse reactions generating reactive oxygen species (ROS) that oxidize proteins, lipids and nucleic acids. Carbonyl derivatives, a product of protein oxidation, reflect cell modifications induced by multiple forms of ROS. Oxidative modification of proteins can also give rise to intra- or inter-protein cross-linked derivatives, demonstrated by reactions with the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-noneal (HNE). As a result, cleavage of the polypeptide chain, modification of amino acid side chains, and conversion of protein to derivatives that are highly sensitive to proteolytic degradation, lead to protein inactivation (Stadtman and Levine, 2003).

Hyperammonemia is a metabolic disturbance characterized by an increase in blood ammonia which consequently results in an increase in brain ammonia (Felipo and Butterworth, 2002). Recent studies have demonstrated ammonia neurotoxicity induces oxidative stress (Norenberg et al., 2004). Studies using cultured astrocytes have demonstrated an acute treatment of 5 mM ammonia induces oxidative stress (Norenberg et al., 2007; Warskulat et al., 2002). In animal models of acute liver failure, ammonia-induced oxidative stress has also been observed (Reddy et al., 2004; Sathyasaikumar et al., 2007). Acute intoxication with high concentrations of ammonia 12 mmol/kg (intraperitoneally) or 60 mM (intrastratially) in rats has been shown to generate free radicals (Hilgier et al., 2003; Kosenko et al., 2003). Overall, studies demonstrating ammonia-induced oxidative stress have been involved in either acute liver failure or acute ammonia intoxication models. However the role of ammonia and oxidative stress in HE associated with chronic liver failure remains undefined. Using a 4-week portal-systemic shunting rat model, our aim was to investigate the role of oxidative stress in this chronic hyperammonemia, Type B minimal HE model (Butterworth et al., 2009). To determine the effect of oxidative stress in the systemic circulation and central nervous system, ROS-induced protein modifications, HNE-linked proteins and carbonyl detection, were assessed in arterial plasma and frontal cortex of rats with portacaval anastomosis (PCA).

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Five male Sprague-Dawley rats (250-275 g) underwent end-to-side PCA, according to Lee and Fisher, (1961). Laparotomy was performed and inferior vena cava and portal vein were isolated. The portal vein was ligated and cut. The inferior vena cava was clamped and an elliptical piece 1.5 times the diameter of the portal vein was removed. The end-to-side PCA was performed under a surgical microscope in less than 15 min. Five control rats of the same sex and age underwent a sham operation where the inferior vena cava and portal vein were isolated and clamped for 15 min, without performing the end-to-side PCA. All rats were sacrificed 4 weeks after surgery by decapitation.

Cerebrospinal fluid (CSF) sampling

CSF was collected by inserting a catheter into the cisterna magna. The rat was anesthetised with isoflurane and the skull was immobilized in a stereotaxic apparatus. An incision was made on the back of the head and the occipital bone was exposed. A dental burr was used to drill a hole on the sagittal midline rostral to the interparietal-occipital bone suture. A PE-10 tubing catheter was inserted into the cisterna magna through the dura mater. Silastic tubing was attached to the catheter and to a 22G^{1/2} needle connected to a syringe. CSF was collected and immediately frozen in deeply cooled isopentane. After this procedure, arterial plasma and brain samples were collected, immediately frozen and stored at -80°C.

Experiments were conducted following the Guidelines of Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Protection Committee of CHUM Research Center.

Measurement of ammonia concentration

Ammonia concentrations were measured in arterial plasma and CSF using a commercial kit (Sigma, St. Louis, MO). Ammonia concentrations were assessed based on the reaction with α -ketoglutarate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in presence of L-glutamate dehydrogenase. Oxidation rate of NADPH was recorded by the decrease in absorbance at 340 nm. Ammonia concentration was calculated according to the manufacturer's protocol.

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance of difference was tested with the Student t-test using GraphPad Prism 4 (La Jolla, CA). Probability values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Tissue preparation

Frontal cortex (PCA or sham [n = 5]) was homogenized in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1/500 cold protease inhibitor cocktail, [Sigma]). Homogenates were centrifuged 40 min at 13,000 g at 4°C. The cleared supernatant was taken and protein content was determined according to the method of Lowry et al., (1951).

Measurement of HNE modified proteins by immunoblotting

Samples containing 75 µg of cortex proteins or 50 µg plasma proteins were separated by 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels electrophoresis (SDS-PAGE), and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% skim milk in TBS-T buffer (1 mM Tris, 10 mM NaCl and 0.5% Tween-20) for 1 h at room temperature and followed by 1 h incubation with primary antibodies. Plasmatic proteins were incubated with goat polyclonal anti-HNE antibody (Academy Bio-Medical, Houston, TX) at a dilution of 1:500 and cortex proteins with rabbit polyclonal anti-HNE antibody (Calbiochem, San Diego, CA) at a dilution of 1:1000. Membranes were washed 3 times in TBS-T buffer for 5 min and then incubated for 1 h at room temperature, with the corresponding secondary antibody labelled with horseradish peroxidase (HRP) at a dilution of 1:10 000 and washed 3 times in TBS-T buffer for 5 min. Immunoreactivity was detected with chemiluminescence reagent (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and probed on X-ray film (UXR, Dorval, QC). A monoclonal antibody to β -actin (Sigma) was used at a dilution of 1:200 000 as a control of protein loading.

Measurement of carbonyl group on proteins side chains

Carbonyl groups on proteins were detected by a commercial kit (Oxy BlotTM Protein Oxidation Detection Kit, Millipore, Billerica, MA). Cortex or plasma protein samples (20 µg) were mixed with 12% SDS. Derivation was done by adding 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution and incubated at room temperature for 15 min and stopped with a neutralization

solution. The DNP-derivatized proteins samples were separated by SDS-PAGE followed by western blot using an anti-DNP antibody, at a dilution of 1:300, and with a goat anti-rabbit HRP-conjugated antibody (dilution of 1:300).

RESULTS

PCA is a widely-used animal model characterised with minimal HE and hyperammonemia (Butterworth et al., 2009). The concentration of ammonia in arterial plasma was significantly higher in PCA vs sham-operated control rats ($142.3 \mu\text{M} \pm 12.0$ vs $83.7 \mu\text{M} \pm 5.4$). Centrally, in the CSF, ammonia was significantly higher in PCA vs sham-operated controls ($135.1 \mu\text{M} \pm 22.9$ vs $22.0 \mu\text{M} \pm 8.2$ respectively) (Fig. 1).

In order to evaluate the status of oxidative stress, HNE-linked proteins and carbonyl levels on protein side chains (oxidative stress markers) were assessed in arterial plasma and frontal cortex tissue by western blot. HNE derivatives did not demonstrate any significant difference in PCA rats compared with sham-operated controls in both arterial plasma (Fig. 2A) and frontal cortex (Fig. 2B). No significant difference was found in carbonyl levels on protein side chains in both arterial plasma (Fig. 3A) and frontal cortex (Fig. 3B), between PCA and sham-operated controls.

DISCUSSION

Hyperammonemia, leading to neurotoxic concentrations of ammonia, is an important factor in the pathogenesis of HE however its exact mechanisms of brain impairment are unclear. PCA shunts gut-derived ammonia from the portal vein to the systemic circulation (inferior vena cava) and results in hyperammonemia and HE, commonly seen in cirrhotic patients following a transjugular intrahepatic portosystemic shunt (Masson et al., 2008). The present study demonstrates that a significant increase in arterial plasma and CSF ammonia levels in PCA rats does not lead to an increase in oxidative stress (HNE and carbonyl derivatives) in both arterial or CSF compared to sham-operated controls.

Recently, oxidative stress has been demonstrated to play a role in the pathogenesis of HE (Norenberg et al., 2004). Cultured astrocytes treated with 5 mM ammonia (for < 24 h) results in an increase in lipid peroxidation and protein carbonyls, two markers of oxidative stress (Norenberg et al., 2007; Widmer et al., 2007). Furthermore, HO-1 expression (mRNA and protein), another marker of oxidative stress, increases following 72 h of ammonia treatment to cultured astrocytes (Warskulat et al., 2002). Similar results have been found when naïve animals are injected with a high dose of ammonia. Acute ammonia injection to rats leads to an increase in lipid peroxidation, a decrease in antioxidant enzyme activities and in glutathione reserves (Kosenko et al., 2003), along with an increase in HO-1 protein (Warskulat et al., 2002). The induction of acute ammonia-induced oxidative stress occurs within 11 min following an intraperitoneal injection of 12 mmol/kg ammonia with an increase in superoxide radical production (Kosenko et al., 2003).

To date, most *in vivo* studies have associated oxidative stress with HE in models of acute liver failure, which are characterized with hyperammonemia, increased brain ammonia, brain edema, intracranial hypertension, severe HE and death. Oxidative stress was demonstrated in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure (Bruck et al., 1999; Reddy et al., 2004; Sathyasaikumar et al., 2007) with blood and brain ammonia levels of ~1.5 mM and ~710 μ M respectively (Sathyasaikumar et al., 2007). In our present study, the 4-week PCA model of chronic hyperammonemia and minimal HE was not accompanied with an induction of oxidative stress. This suggests acute and high ammonia, and not chronic moderate hyperammonemia, induces oxidative stress and may be implicated in brain edema and/or severe HE.

Ammonia-induced oxidative stress, usually a result of decreased antioxidant capacity (Sathyasaikumar et al., 2007), leads to cellular protein modifications and dysfunction (Norenberg et al., 2004). Hilgier et al., (2003) showed an accumulation of hydroxyl radicals in the microdialysates following ammonia intoxication (60 mM) intrastrially via a microdialysis probe. This increase was seen at 160 min following the injection, but returned to baseline levels after 240 min, suggesting this ammonia-induced ROS increase is transient. Numerous studies have demonstrated treatment with antioxidants against ammonia-induced oxidative stress is very efficacious (Bruck et al., 1999; Guerrini, 1994; Widmer et al., 2007) implying oxidative stress is treatable and reversible. However it is uncertain whether the beneficial effect of antioxidants is a direct effect on attenuating oxidative stress or solely by ameliorating the liver and subsequently reducing ammonia.

In present study, oxidative modification of proteins involving HNE derivatives and carbonyl levels in protein side chains in plasma and frontal cortex were unchanged between PCA and sham-operated controls rats. This suggests PCA-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress in either blood or brain. One explanation may be due to the subtle increase in blood and brain ammonia. Compared to ammonia-treated induction of oxidative stress in both *in vitro* and *in vivo* models, a concentration of ~150 μM found in PCA rats is relatively low. Furthermore, oxidative stress may only be implicated in severe HE or death as demonstrated in the acute ammonia-intoxication models compared to the PCA rat, a Type B model of minimal HE (Butterworth et al., 2009). Therefore chronic and moderate hyperammonemia in PCA rats is not suffice to induce oxidative stress.

In conclusion, a 4-week PCA rat of minimal HE and moderate hyperammonemia didn't express any signs of oxidative stress in either the systemic circulation or the central nervous system. The absence of oxidative stress might be due to a chronic moderate elevated ammonia levels and/or a compensated functional antioxidant system.

References

- Blendis, L. (2006). Hepatic encephalopathy forward to the past. *Gastroenterology* 130: 2239-2240.
- Bosoi, C.R. and Rose, C.F. (2009). Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* 24: 95-102.
- Bruck, R., Aeed, H., Shirin, H., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y. and Halpern, Z. (1999). The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J. Hepatol.* 31: 27-38.
- Butterworth, R.F. (2003). Hepatic encephalopathy-a serious complication of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 27: 143-145.
- Butterworth, R.F., Norenberg, M.D., Felipo, V., Ferenci, P., Albrecht, J., Blei, A.T. (2009). Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int.* 29: 783-788.
- Choi, J.H. and Yu, B.P. (1995). Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 133-139.
- Felipo, V. and Butterworth, R.F. (2002). Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67: 259-279.
- Guerrini, V.H. (1994). Effect of antioxidants on ammonia induced CNS-renal pathobiology in sheep. *Free Radic. Res.* 21: 35-43.
- Hazell, A.S. and Butterworth, R.F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 99-112.

- Hilgier, W., Anderzhanova, E., Oja, S.S., Saransaari, P. and Albrecht, J. (2003). Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 468: 21-25.
- Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C. and Felipo, V. (2003). Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res.* 981: 193-200.
- Lee, S.H. and Fisher, B. (1961). Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 50: 668-672.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Masson, S., Mardini, H.A., Rose, J.D. and Record, C.O. (2008). Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt insertion: a decade of experience. *QJM* 101: 493-501.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R. and Rama Rao, K.V. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 313-329.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V. and Panickar, K.S. (2007). New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 22: 219-234.
- Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G. and Butterfield, D.A. (2004). Free radicals and brain aging. *Clin. Geriatr. Med.* 20: 329-359.
- Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K. and Reddanna, P. (2004). Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci. Lett.* 368: 15-20.

Sathyasaikumar, K.V., Swapna, I., Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K., Dutta Gupta, A., Senthilkumaran, B. and Reddanna, P. (2007). Fulminant hepatic failure in rats induces oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla. *Neurochem. Res.* 32: 517-524.

Stadtman, E.R. and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218.

Warskulat, U., Görg, B., Bidmon, H., Müller, H.W., Schliess, F. and Häussinger, D. (2002). Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 40: 324-336.

Widmer, R., Kaiser, B., Engels, M., Jung, T. and Grune, T. (2007). Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondria-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 464: 1-11.

FIGURES LEGENDS

Fig. 1: Ammonia concentrations in plasma and CSF from PCA and sham-operated control rats. Results are expressed as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.005$ as compared to sham-operated rats.

Fig. 2: Detection of HNE-linked proteins in arterial plasma (A) and frontal cortex (B) from PCA and sham-operated control rats.

Fig. 3: Detection of carbonyl groups on protein side chains in arterial plasma (A) and frontal cortex (B) from PCA and sham-operated control rats.

Fig 1:

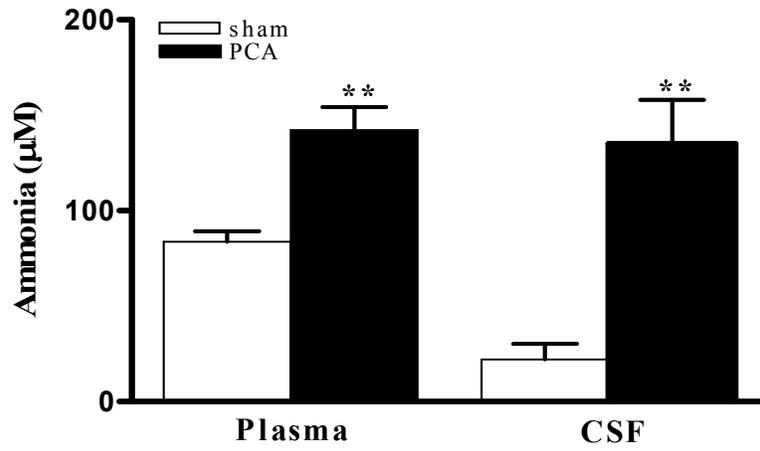


Fig 2A:

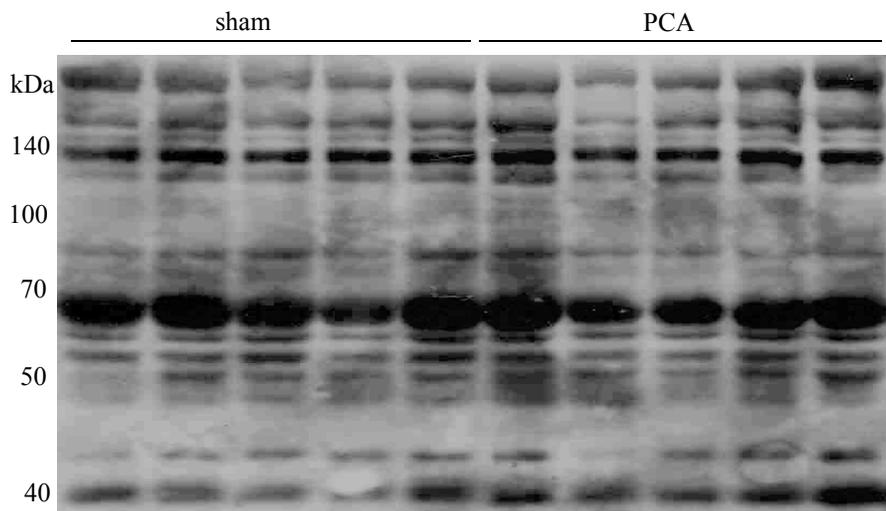


Fig 2B:

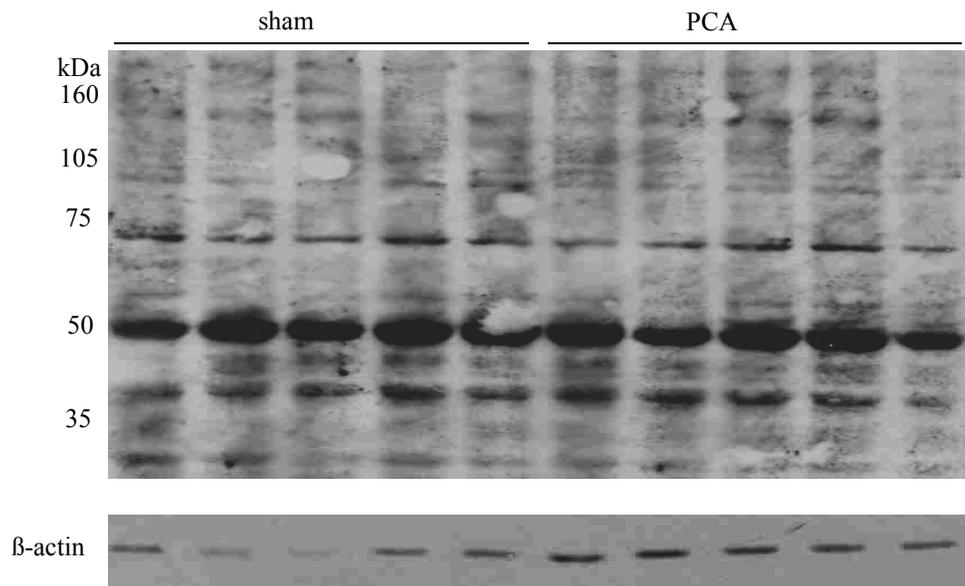


Fig 3A:

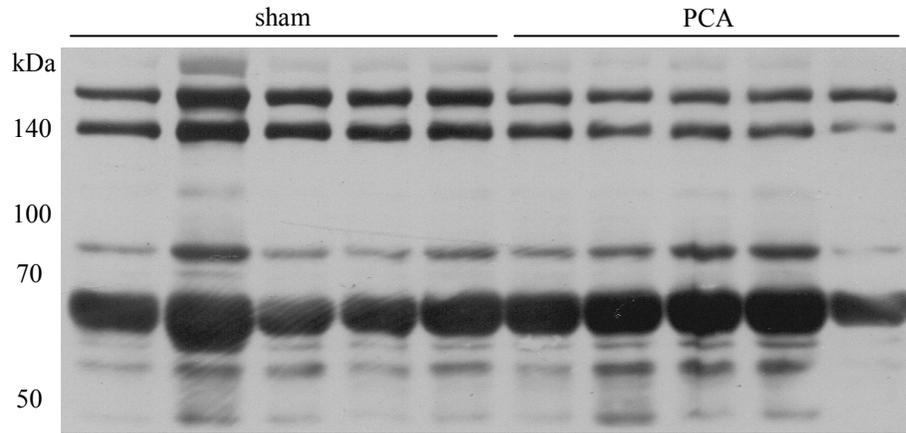


Fig 3B:

