

Université de Montréal

Effet des différents composés de la matrice extracellulaire
du foie sur la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose.

Par
Éric Bourbonnais

Département des Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences biomédicales

Août 2005

© Éric Bourbonnais, 2005



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire intitulé

Effet des différents composés de la matrice extracellulaire
du foie sur la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose

présenté par

Éric Bourbonnais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Fernando AlvarezPrésident-rapporteur
D^r Marc Bilodeau.....Directeur de recherche
D^r Manuela Santos.....membre du jury

mémoire accepté le :.....

Sommaire

L'apoptose est un phénomène essentiel à l'homéostasie du foie. La matrice extra-cellulaire est un élément important de l'environnement de chaque cellule de l'organisme et intervient dans plusieurs fonctions cellulaires. La quantité de matrice dans le foie augmente en situation pathologique. La fibrose hépatique consiste en la production accrue de protéine de la matrice, principalement le collagène de type I, afin de protéger le tissu hépatique. Nous émettons donc l'hypothèse que la matrice extra-cellulaire du foie protège au moins partiellement les hépatocytes contre l'apoptose.

In vitro, l'apoptose, induite par le Fas et par le TNF- α , a été analysée sur culture d'hépatocytes de souris en présence d'éléments de la matrice, soit le collagène de type I ou la fibronectine. *In vivo*, des souris ont été injectées durant 12 semaines avec de la thioacétamide afin d'induire une fibrose hépatique. Une injection subséquente d'anti-Fas a servi d'inducteur d'apoptose hépatique. Des analyses protéiques des membres de la famille Bcl-2 ainsi que des dosages d'activités caspase ont été effectués dans les deux cas afin d'analyser la réaction apoptotique.

Les résultats obtenus ont démontré que le collagène protège les hépatocytes de l'apoptose. Il agit en réduisant l'activité des caspases et en modifiant l'expression des protéines de la famille Bcl-2 via une activation de la voie des MAPK. De son côté, la fibronectine a favorisé l'apoptose des hépatocytes *in vitro*.

La matrice extra-cellulaire joue donc un rôle important dans l'apoptose des hépatocytes. Le collagène de type I protège contre l'apoptose tant *in vitro* que *in vivo*, alors que la fibronectine promeut l'apoptose *in vitro*.

Mots-clés : Apoptose, matrice extra-cellulaire, fibrose, collagène, Fas, MAPK, famille Bcl-2.

Apoptosis is essential for the liver homeostasis. The extra-cellular matrix is an important component of the cell environment that plays a key role in many cellular functions. The quantity of matrix increases in pathological situations. Hepatic fibrosis is basically an augmentation of the production and of the deposition of matrix proteins, essentially type I collagen, to protect the hepatic tissue. We therefore hypothesize that the liver extra-cellular matrix protects at least partially the hepatocytes against apoptosis.

In vitro, apoptosis, induced by Fas or by TNF- α , was analyzed in mouse primary hepatocyte cultures in the presence of matrix components, either type I collagen or fibronectin. *In vivo*, mice were injected during 12 weeks with thioacetamide to induce liver fibrosis. A subsequent anti-Fas injection was given to induce massive hepatic apoptosis. Protein analysis of the Bcl-2 family members and caspase activity measurements were made in both cases to assess the apoptotic reaction.

Our results show that collagen protects hepatocyte against apoptosis. It reduces caspase activity and modifies the Bcl-2 family protein expression by activating the MAPK pathway. On the other hand, fibronectin promotes hepatocyte apoptosis *in vitro*.

The extra-matrix therefore plays an important role in hepatocyte apoptosis. Type I collagen protects hepatocytes, both *in vitro* and *in vivo*, and fibronectin increases apoptosis *in vitro*.

Keywords: Apoptosis, extra-cellular matrix, fibrosis, collagen, Fas, MAPK, Bcl-2 family protein.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU FOIE	2
1.1 <i>État physiologique</i>	2
1.2 <i>État pathologique</i>	5
2 MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE FIBROSE HÉPATIQUE	6
2.1 <i>Effets macroscopiques de la thioacétamide</i>	6
2.2 <i>Effets cellulaires de la thioacétamide</i>	7
3 INTERACTIONS ENTRE LES HÉPATOCTES ET LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE.....	9
3.1 <i>Récepteurs de la matrice extra-cellulaire</i>	9
3.2 <i>Signalisation des intégrines</i>	10
3.3 <i>Effet cellulaire de l'activation des ERK1 et 2</i>	12
4 INDUCTION DE L'APOPTOSE.....	13
4.1 <i>La voie du récepteur Fas</i>	13
4.2 <i>La voie du TNF-α</i>	14
4.3 <i>Déroulement de la réaction apoptotique</i>	15
4.3.1 <i>Caspases activatrices</i>	15
4.3.2 <i>Protéines de la famille Bcl-2</i>	16
4.3.3 <i>Activation des caspases effectrices</i>	17
5 RELATION ENTRE LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE ET L'APOPTOSE	19
5.1 <i>Résistance des hépatocytes à l'anoïkis par l'activation d'une intégrine</i>	19
5.2 <i>Résistance à l'apoptose par l'activation d'une intégrine</i>	20
6 PRÉMISSSES ET HYPOTHÈSE	21
MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
1 MATÉRIEL	23
2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	23
2.1 <i>Animaux</i>	23
2.2 <i>Isolation d'hépatocytes</i>	24
2.3 <i>Mise en culture</i>	24
2.4 <i>Préparation des différentes matrices extracellulaires</i>	25
3 ANALYSES CYTOLOGIQUES	26
3.1 <i>Quantification de l'apoptose par coloration de la chromatine</i>	26
4 ÉTUDES <i>IN VIVO</i>	28
4.1 <i>Injection de thioacétamide</i>	28
4.2 <i>Injection d'anti-Fas et sacrifice des souris</i>	28
4.3 <i>Dosage de l'alanine-aminotransférase (ALT) sérique</i>	29
5 MESURES DE FIBROSE.....	30
5.1 <i>Coloration au rouge Sirius</i>	30

5.2	<i>Dosage de l'hydroxyproline</i>	31
6	ANALYSES DES PROTÉINES	32
6.2	<i>Électrophorèse et transfert sur membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF)</i>	33
6.3	<i>Immunobuvardage</i>	34
7	STATISTIQUES	35
RÉSULTATS		36
1	EFFET DES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SUR L' APOPTOSE DES HÉPATOCTES.....	37
1.1	<i>Effet du collagène</i>	37
1.3	<i>Protection du collagène contre l'apoptose induite par l'actinomycine D et le TNF-α</i>	39
1.4	<i>Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes</i>	40
2	LA VOIE DES MAPK, ERK 1 ET 2	42
2.1	<i>Activation des ERK1 et 2</i>	42
2.2	<i>Effets des inhibiteurs de la voie des MAPK sur l'apoptose</i>	43
2.3	<i>Souris transgéniques ERK1 -/-</i>	43
2.4	<i>Effet de l'EGF sur l'apoptose des hépatocytes</i>	45
3	EFFET DU COLLAGÈNE SUR L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE LA FAMILLE BCL-2 ET SUR L'ACTIVATION DES CASPASES.....	47
3.1	<i>Réduction de l'expression de protéines pro-apoptotiques in vitro</i>	47
3.2	<i>Expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L</i>	47
3.3	<i>Effet de l'inhibiteur U0126 sur l'expression de la protéine Bid</i>	49
3.4	<i>Effet du collagène sur l'activation des caspases in vitro</i>	50
4	EFFETS DES INJECTIONS DE THIOACÉTAMIDE ET DE LA PÉRIODE DE RÉCUPÉRATION.....	52
4.1	<i>Mesure de l'état de l'étendue de la fibrose</i>	52
4.2	<i>Dosage d'hydroxyproline</i>	53
4.3	<i>Activation de la voie des MAPK</i>	54
5	TAUX DE SURVIE À L'INJECTION D'ANTI-FAS	55
6	EFFET DE LA FIBROSE SUR L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE LA FAMILLE BCL-2.....	56
6.1	<i>Expression des protéines de la famille Bcl-2</i>	56
6.2	<i>Niveau de clivage de la protéine Bid</i>	58
7	EFFET DE LA FIBROSE SUR L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3	60
DISCUSSION		61
1	SIGNALISATION ET RÔLE DU COLLAGÈNE DANS L' APOPTOSE DES HÉPATOCTES	62
1.1	<i>Présence du collagène dans le foie</i>	62
1.2	<i>Signalisation du collagène</i>	62
1.3	<i>Effet du collagène de type 1 sur l'apoptose des hépatocytes</i>	64
1.4	<i>Influence du collagène sur la réaction apoptotique</i>	645

2	SIGNALISATION ET RÔLE DE LA FIBRONECTINE DANS L'APOPTOSE DES HÉPATOCYTES	656
2.1	<i>Signalisation de la fibronectine</i>	66
2.2	<i>Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes</i>	66
3	MODULATION DES SIGNAUX DE SURVIE CELLULAIRE	67
3.1	<i>Inhibition du signal des MAPK</i>	67
3.2	<i>Souris transgéniques ERK1 knock-out</i>	68
3.3	<i>Saturation du signal MAPK</i>	69
3.4	<i>Voie de la PI3-K et de l'AKT</i>	69
4	EFFET DE LA THIOACÉTAMIDE.....	70
4.1	<i>Score de Ishak et dosage d'hydroxyproline</i>	70
4.2	<i>Induction de la fibrose</i>	71
4.3	<i>Période de récupération</i>	71
5	EFFET DE LA FIBROSE SUR L'APOPTOSE	72
5.1	<i>Résistance aux injections d'anti-Fas</i>	72
5.2	<i>Activité MAPK dans les foies fibrotiques</i>	73
5.3	<i>Effet de la fibrose sur les protéines impliquées dans l'apoptose</i> ..	74
6	IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES	75
	CONCLUSION	77
	BIBLIOGRAPHIE	79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Évaluation de la fibrose par score de Ishak.....	30
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés	35
Tableau 3 : Score de Ishak	52
Tableau 4 : Taux de survie des souris injectées avec l'anti-Fas.	55

Liste des figures

Figure 1 : Modèle de lobule hépatique	4
Figure 2 : La réaction apoptotique chez les hépatocytes.	18
Figure 3 : Exemple de coloration au Hoechst 33258 d'hépatocytes de souris en culture primaire.....	27
Figure 4 : Effet du collagène de type I sur l'apoptose des hépatocytes ...	37
Figure 5 : Effet du collagène sur l'apoptose des hépatocytes dans le temps.....	38
Figure 6 : Effet de la concentration de collagène sur l'apoptose.....	38
Figure 7 : Effet du collagène sur l'apoptose induite par le TNF- α	39
Figure 8 : Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes	40
Figure 9 : Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes dans le temps	41
Figure 10 : Effet de la concentration de fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes.....	41
Figure 11 : Activation des MAPK.....	42
Figure 12 : Effet des inhibiteurs d'activation des voies de survie cellulaire	44
Figure 13 : Protection du collagène contre l'apoptose des hépatocytes chez les souris ERK1 -/-.....	45
Figure 14 : Effet de l'EGF sur l'apoptose des hépatocytes en présence de collagène.....	46
Figure 15 : Expression différentielle des protéines pro-apoptotiques en présence de collagène	48
Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x _L en présence de collagène.....	49
Figure 17 : Effet de l'inhibition de l'activation des MAPK sur l'expression de la protéine Bid	50
Figure 18 : Effet du collagène sur l'activation des caspases activatrices et effectrices.....	51
Figure 19 : Effet du traitement à la thioacétamide sur la teneur du foie en collagène.....	53
Figure 20 : Niveau d'expression des ERK1 et 2 phosphorylées dans les foies traités à la thioacetamide.....	54
Figure 21 : Effet du traitement fibrogénique sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2.....	57
Figure 22 : Effet de la fibrose sur le clivage de la protéine Bid	59
Figure 23 : Effet des traitements de thioacétamide sur l'activité de la caspase-3.....	60

Liste des sigles et abréviations

α -SMA	Actine de muscle lisse de type α (α -smooth muscle actin)
ActD	Actinomycine D
ALT	Alanine aminotransférase
Apaf-1	Facteur d'activation de protéase de l'apoptose (Apoptose protease activating factor)
AKT	Protéine kinase B
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine bovine sérique (Bovine serum albumin)
BH1 à 4	Domaine d'homology à Bcl-2 1 à 4 (Bcl-2 homology domain 1 to 4)
DTT	Dithiotréitol
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor)
ERK	Kinase répondant à un signal extra-cellulaire (Extra-cellular responsive kinase)
FAK	Kinase de contacts focaux (Focal adhesion kinase)
FLICE	Enzyme de conversion de l'interleukin 1 β ressemblant à FADD (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)
IAP	Inhibiteur d'apoptose (Inhibitor of apoptosis)
MAPK	Kinase activée par un mitogène (Mitogen activated protein kinase)
MEK	Kinase de MAP/ERK (MAP/ERK kinase)
NADPH	Forme réduite de la phosphonicotinamide adénine dinucléotide (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)
NGF	Facteur de croissance neuronal (Nerve growth factor)
PBS	Saline tamponée de phosphate (Phosphate buffered saline)
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase (Phosphoinositide 3-kinase)
PVDF	Polyvinylidène fluorure
ROS	Radicaux oxygénés (Reactive oxygen species)
SHC1	Protéine transformante contenant le domaine d'homologie Src2 #1 (Src homology 2 domain containing transforming protein1)
TAA	Thioacétamide
TAP	Protéine associée à TIP (Tip associating protein)
tBid	Bid tronquée (Truncated Bid)
TGF- β	Facteur de croissance transformant β (Transforming growth factor β)
TIMP	Inhibiteur spécifique de métallo protéinase (Tissue specific inhibitor of metalloproteinase)
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α (Tumor necrosis factor α)
TNFR1	Récepteur #1 au facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor receptor 1)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma famille pour leur soutien de toujours; ma conjointe Geneviève pour son support quotidien et mes parents, Serge et Monique, pour m'avoir permis de réussir tout ce que j'ai accompli.

Je veux aussi remercier le D^r Marc Bilodeau et son équipe de recherche, qui m'ont donné ma première chance dans le domaine et qui m'ont transmis leur passion pour la recherche. Merci au D^r Marc Bilodeau pour avoir dirigé mes recherches et pour avoir cru en mes capacités, et merci à Valérie-Ann Raymond et Chantal Éthier pour leur conseil, leur expérience et surtout pour m'avoir supporté pendant plus de deux ans.

J'ai aussi une pensée pour tous les autres personnes que j'ai pu côtoyer durant mon passage au centre de recherche du CHUM – Hôpital St-Luc, pour avoir rendu agréable mon séjour parmi eux.

Introduction

1 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU FOIE

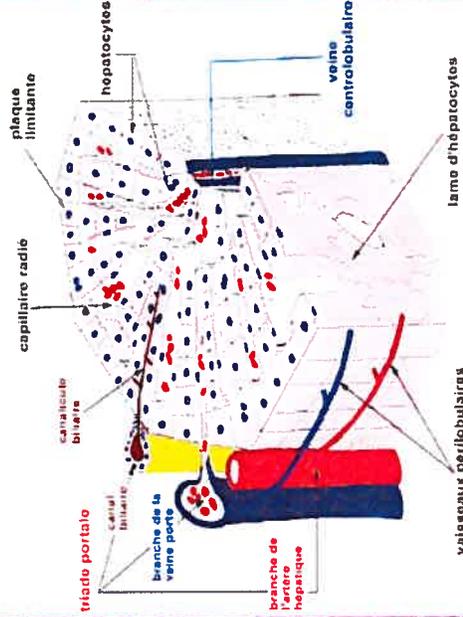
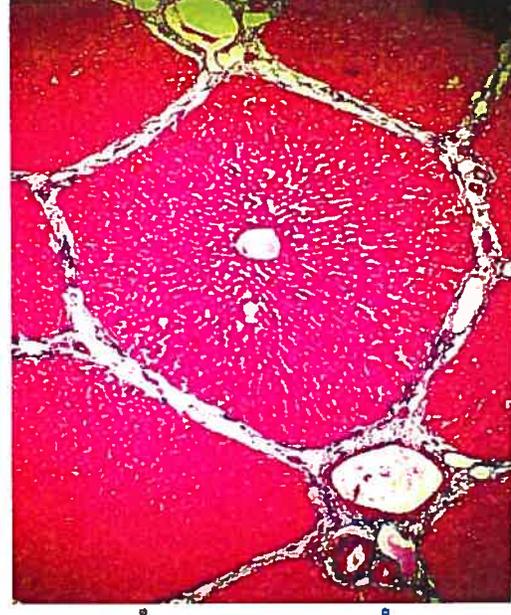
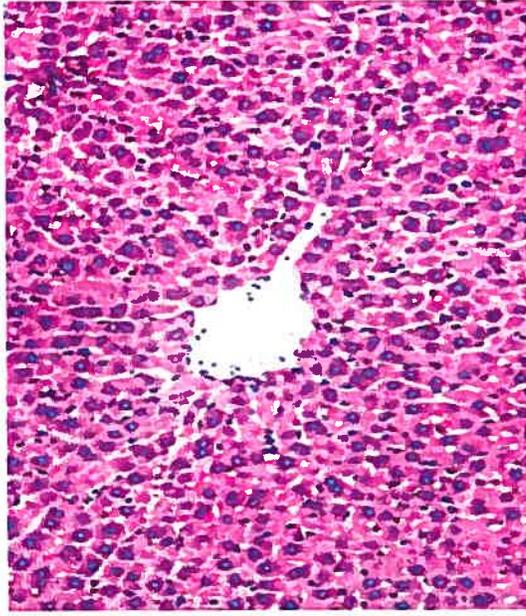
1.1 État physiologique

Le foie joue un rôle clé dans l'organisme. Il est notamment responsable de la détoxification de plusieurs métabolites, du recyclage des globules rouges et de l'hémoglobine ainsi que du stockage de substances essentielles pour l'organisme, dont notamment le glucose. Sa structure est particulière et subdivisée en unité fondamentale appelée lobule hépatique caractérisé par la disposition organisée des différents vaisseaux sanguins. Le foie est aussi particulier parce qu'il contient très peu de matrice extra-cellulaire¹. Malgré tout, une grande variété de molécules de la matrice est présente dans le foie. Les collagènes de types I, III, IV, V, VI, VIII, XIV, XV, XVIII et XIX²⁻³, ainsi que la fibronectine, les laminines (types 1 à 7) et le perlécane⁴⁻⁵ en sont les principaux éléments. D'autres éléments sont également présent mais en proportion plus faible, comme l'acide hyaluronique, l'élastine, la thrombospondine et la ténascine⁶. Dans un foie sain, les différents types de collagènes correspondent à un minimum de 80% des protéines de la matrice et le collagène de type I est de loin la molécule la plus abondante^{7,6}.

Les cellules étoilées du foie sont les grandes responsables de la synthèse de la matrice du foie^{8,9}. D'autres types cellulaires y contribuent également mais de manière moins importante. Les hépatocytes peuvent notamment produire certains types de collagène et de la fibronectine¹⁰, mais tant au point de vue de la diversité qu'au niveau de la quantité de matrice, les cellules étoilées sont les principales responsables de l'environnement matriciel du foie. Historiquement, ces cellules ont porté plusieurs noms. Elles ont été appelées lipocytes, ou cellules

d'entreposage de gras (fat storing cell), cellules de Ito, cellules stellaires et bien d'autres. Outre la synthèse de matrice extra-cellulaire, les cellules étoilées sont également la banque de stockage de la vitamine A pour l'organisme¹¹. Ces cellules ne sont pas uniquement responsable de la production, mais aussi de la dégradation de la matrice¹². Plusieurs types de métalloprotéinases sont produites par les cellules étoilées pour pouvoir façonner la structure matricielle du foie. Les métalloprotéinases sont des enzymes de dégradations de la matrice et sont spécifiques à un ou des types particuliers de protéines matricielles. La quantité et l'expression différentielle des différents types de métalloprotéinases permettent un contrôle précis de la composition matricielle du foie.

Le principal type cellulaire du foie, est représenté par les hépatocytes, qui correspondent à environ 80% de la totalité des cellules hépatiques. Les hépatocytes sont des cellules épithéliales, mais ne reposent pas sur une membrane basale. Les hépatocytes sont en fait en contact avec très peu de matrice extra-cellulaire. Ces contacts se produisent principalement au niveau des espaces de Disse (régions se situant entre les hépatocytes est les sinusoides (petit vaisseau s'étirant entre les rangées d'hépatocytes) où se déroule la majorité des échanges entre les hépatocytes et leur milieu) où plusieurs éléments de la matrice extracellulaire ont pu être retrouvés⁸, comme par exemple les collagènes de type I et III, la fibronectine et le perlécan²⁻³. La majeure partie de la matrice présente dans le foie se retrouve au niveau des régions avoisinant les vaisseaux originant du réseau de la veine porte. Selon le modèle actuel de l'architecture du foie, des « rangées » d'hépatocytes sont disposées entre les vaisseaux portaux jusqu'aux zones centrales avoisinant une veine hépatique. Très peu de matrice se retrouve entre les rangées d'hépatocytes en situation physiologique. Les hépatocytes sont en général liés entre eux via des jonctions intercellulaires situées autour des canalicules biliaires au lieu d'être attachés à une membrane basale.



Tirés de <http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/liver/thmbnls/plb1.htm>, <http://www.ann.jussieu.fr/~thiriet/csas/Glosr/Bio/Foie/HistoFoie.html> et de <http://xavier.xula.edu/cdoumen/HistoFolder/Framedir5.html>

Figure 1 : Modèle de lobule hépatique.

- A) Photo microscopique d'un foie de souris
- B) Schéma de la modélisation de la structure d'un lobule hépatique.
- C) Photo microscopique d'un lobule hépatique de porc

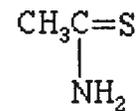
1.2 État pathologique

Suite à une stimulation prolongée par une substance hépatotoxique (alcool, virus ou autres) ou par l'agression immunitaire chronique, les cellules étoilées se différencient et deviennent activées^{11,13}. Une cellule étoilée activée produit une grande quantité de matrice extra-cellulaire. De plus, elle d'exprime différenciellement une panoplie d'inhibiteurs de métalloprotéinase ou TIMP (Tissue specific inhibitor of metalloproteinase)¹². Cette combinaison cause une augmentation de la quantité de matrice présente dans le foie. Les cellules étoilées activées ressemblent à des myofibroblastes et sont identifiables par l'expression de l'actine de muscle lisse de type α (α -SMA, smooth muscle actin)¹⁴. Tous les constituants normaux de la matrice extra-cellulaire se retrouvent en plus grande quantité mais la synthèse et le dépôt de collagène de type I est favorisé dans le processus fibrogénique¹¹⁻¹³. De longues fibres de collagène viennent s'étirer entre les rangées d'hépatocytes. On parle alors de fibrose hépatique. Selon la gravité de la fibrose, les fibres de collagène seront plus ou moins importantes et parviendront dans certains cas jusqu'aux régions centrales¹⁵. Dans les cas majeurs de fibrose, les cellules étoilées expriment davantage de métalloprotéinases spécifiques aux composés matriciels autre que le collagène, tout en augmentant la synthèse de TIMP-1, qui inhibe la dégradation du collagène¹². Dans les cas les plus graves, des îlots d'hépatocytes se retrouvent complètement encerclés par des fibres de collagène. On parle alors de cirrhose, une condition pathologique qui peut être létale et qui peut nécessiter une transplantation¹⁶. L'accumulation de ces fibres de collagène est considérée comme nécessaire à protéger le tissu hépatique d'une nouvelle atteinte et à la guérison des lésions^{13,17}. Les fibres de collagènes sont en fait du tissu cicatriciel. Leur composition riche en collagène de

type I et leur fonction de protection rappellent les cicatrices cutanées conventionnelles.

2 MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE FIBROSE HÉPATIQUE

2.1 Effets macroscopiques de la thioacétamide



La thioacétamide est une petite molécule organique formée de deux carbones avec un groupement amino et un atome de soufre liés à un même carbone (CH_3CSNH_2). Elle est utilisée comme modèle expérimental afin d'induire une fibrose hépatique *in vivo* depuis plus de 50 ans¹⁸. Certains l'utilisent sur de longue période, tandis que d'autres étudient les effets d'une injection unique. On n'étudie toutefois pas ses effets profibrotiques à ce moment. Outre la thioacétamide, plusieurs autres modèles de fibroses hépatiques ont déjà été développés. Le plus fréquent demeure les injections intra-péritonéales de tétrachlorure de carbone (CCl_4). Ces effets ressemblent beaucoup à ceux de la thioacétamide, mais le CCl_4 est liposoluble, il nécessite donc l'injection d'un solvant sous forme d'huile végétale, ce qui est moins évident sur le point de vue de la manipulation. De plus, l'utilisation de CCl_4 comporte davantage de risque de mortalité durant les premiers jours de traitement¹⁹.

La thioacétamide a surtout été utilisé en raison de son hépatotoxicité, mais elle est aussi étudiée pour d'autres effets, comme ses implications pulmonaires²⁰ (toxicité pulmonaire de la thioacétamide) et spléniques²¹ (augmentation de la concentration splénique de métaux tel que le cuivre et le zinc). En ce qui concerne la fibrose hépatique, l'amplitude du dommage tissulaire est en relation avec la durée de la

période d'induction²². Sur de courte période de traitement, il est possible de voir des atteintes dans le parenchyme hépatique, mais l'apparition de fibres de collagène ne survient qu'à la suite d'un traitement plus étendu. Plus on prolonge le traitement, plus la fibrose sera importante et l'animal peut éventuellement développer une cirrhose²³. Si l'on veut conserver l'état fibrotique chez l'animal traité, il est impératif de poursuivre le traitement, puisque la fibrose est un état pathologique à récupération rapide et spontanée chez l'animal¹².

2.2 Effets cellulaires de la thioacétamide

Les effets hépatotoxiques de la thioacétamide sont multiples. Malgré que son utilisation n'est pas récente, il est encore aujourd'hui difficile d'expliquer clairement son effet sur les cellules du foie. Les premières constatations qui ont suivi l'observation microscopique d'hépatocytes soumis à la thioacétamide ont permis de détecter une augmentation de la taille des nucléoles²⁴. Ce phénomène n'a trouvé une explication qu'en 2003 alors que Beny Spira et Isaias Raw²⁵ ont démontré une réduction de l'expression de deux protéines TAP (Tip Associating Protein) qui sont impliquées dans le transport des différents ARN messager (ARNm). Il y aurait donc congestion d'ARNm au niveau des nucléoles ce qui expliquerait l'augmentation de leur volume. Une légère diminution de la transcription est perceptible mais ceci n'est généralement pas suffisant pour faire varier les niveaux d'expression des différentes protéines cellulaires.

Des études histologiques à partir d'injection unique de thioacétamide par Kojima *et al* ont démontré des variations dans la présence des jonctions Gap (jonctions intercellulaires communicantes)²⁶. En effet, 16h après une injection de thioacétamide, outre la présence de

nécrose, bien peu de changement peuvent être observés dans le parenchyme hépatique. Toutefois, 24 après l'injection de thioacétamide, les jonctions Gap se font rare près des zones de nécrose pour complètement disparaître de lobules hépatiques complets après 48h, malgré une intense activité réplivative. Ces jonctions Gap réapparaissent graduellement après 72h près des zones de nécrose pour revenir à la normale 4 jours après l'injections de thioacétamide. Pendant ce temps d'autres types de jonctions intercellulaires (jonctions serrées et desmosomes) disparaissent des cellules nécrotiques pour ensuite augmenter leur nombre au dessus de la normale entre 24 et 48 heures. Leur expression revient à la normale 72h après l'injection unique de thioacétamide. La thioacetamide joue donc également un rôle important dans la disposition des jonctions intercellulaires des hépatocytes. Il faut rappeler que ces jonctions sont encore plus importants chez les hépatocytes puisque ceux-ci ne reposent pas sur une membrane basale.

Il a également été démontré que la thioacétamide se lie à la sous-unité α de la glutathion-transférase et bloque ainsi légèrement l'assemblage de toutes les sous-unités de l'enzyme finale²⁷. Ceci ne semble toutefois pas suffisant pour faire varier les stocks de glutathion et ne modifiait pas le niveau d'oxydo-réduction de la cellule. Il est donc difficile d'associer ces effets cellulaires à la fibrose hépatique.

Satyabhama et Padmanaban ont démontré que la thioacétamide réduit également la synthèse et l'activité des cytochromes P450b²⁸. Une seule injection de thioacétamide a réduit l'expression de cette enzyme et il a été démontré que cet effet était dû à une diminution de la transcription du gène. La même observation a pu être faite sur des périodes d'injections plus prolongées²⁹. Cette action de la thioacétamide est la plus susceptible d'engendrer la fibrose. En inhibant les fonctions normales de

détoxication hépatique par la réduction de l'activité d'un cytochrome important, la thioacétamide peut causer une accumulation de métabolites toxiques et ainsi engendrer la fibrose hépatique. Ceci n'est toutefois qu'une hypothèse et personne n'a encore pu la démontrer.

Aucun lien direct ou même indirect n'a jamais été fait entre la thioacétamide et les cellules véritablement responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire, soit les cellules étoilées. La compréhension des effets de la thioacétamide est encore bien partielle puisque le processus menant à l'effet justifiant son utilisation, la fibrose hépatique, demeure mal caractérisé. Il s'agit toutefois d'un modèle d'induction de fibrose bien établi puisqu'il est utilisé depuis déjà plus d'un demi-siècle.

3 INTERACTIONS ENTRE LES HÉPATOCTES ET LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE

3.1 Récepteurs de la matrice extra-cellulaire

Les intégrines sont les récepteurs qui assurent l'intermédiaire entre les cellules et son environnement matriciel. Ces molécules sont composées de deux sous-unités, soit α et β qui comportent toutes deux plusieurs sous-types³⁰. Les divers arrangements des sous-unités α et β permettent de former plusieurs intégrines, toutes plus ou moins spécifiques pour des protéines de la matrice extra-cellulaire. On dénombre maintenant plus de 20 types d'intégrines différentes et leur distribution est très variable. Certaines sous-unités se retrouvent à la surface de toutes les cellules, comme la sous-unité β_1 ³¹. D'autres sont

spécifiques à certains types cellulaires. Leur rôle est à la fois très vaste et très vague. On leur attribue un rôle dans la prolifération³², la croissance³³, la migration³⁴ et la différenciation cellulaire³⁵. Le collagène étant la molécule de la matrice la plus abondante de l'organisme, la plupart des effets des intégrines ont été démontrés à l'aide de celle-ci. Toutefois, des études portant sur les effets de la fibronectine sont arrivées à des conclusions similaires^{36,37}. Toutefois, l'analyse de la signalisation cellulaire demeure imprécise. En effet, une même intégrine peut avoir des effets différents chez deux types cellulaires, et employer des voies de signalisations distinctes³⁸. Bien peu d'études se sont attardées aux rôles des intégrines dans le foie. Certains ont étudié l'implication des intégrines dans la différenciation³⁹, la prolifération⁴⁰ et même l'apoptose des cellules étoilées⁴⁰, mais les études portant sur les hépatocytes sont très rares et se résument à l'expression différentielle de certaines intégrines lors de pathologie comme le cancer⁴¹ ou l'hépatite fulminante⁴².

Chez les hépatocytes, la combinaison $\alpha_1\beta_1$ est responsable de la liaison au collagène de type I et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ sert à la liaison de la fibronectine. D'autres combinaisons d'intégrines peuvent lier le collagène ou la fibronectine. Un substrat peut convenir à plusieurs récepteurs, et un récepteur peut être activé par plusieurs substrats³⁰. Les hépatocytes expriment aussi plusieurs autres types d'intégrines, comme L' $\alpha_9\beta_1$ pour le perlécan⁵ et l' $\alpha_6\beta_2$ pour la laminine⁴³, mais l'étude actuelle se limite à ces deux paires ($\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$).

3.2 Signalisation des intégrines

Les intégrines ne sont pas uniquement responsables de l'attachement physique de la cellule à un support matriciel mais elles sont aussi le premier élément de la signalisation intracellulaire qui en

découle⁴⁴. Même si les différentes intégrines se ressemblent beaucoup, et même si dans les deux cas qui nous intéressent (collagène de type I et fibronectine), ils partagent la même sous-unité β , leur signalisation peut différer³⁵ et donc obtenir un résultat sur des éléments distincts ou même complètement opposés.

Il a été démontré que les intégrines sont souvent en étroite relation avec des récepteurs de facteurs de croissance à la périphérie de la cellule en se servant de leur activité tyrosine kinase^{45,46}. Elles emprunteraient donc les mêmes voies de signalisation que ces récepteurs plus traditionnels, comme par exemple la voie de la phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) et de protéine kinase B (AKT) ou la voie les « kinases activées par un mitogène » (MAPK). Les intégrines interagissent aussi directement avec le cytosquelette d'actine au niveau des contacts focaux⁴⁷. Ces contacts permettent entre autres à la cellule de maintenir sa forme et de maintenir des liens intercellulaires. Cette association permet également de protéger la cellule contre un type d'apoptose bien précis, soit l'anoïkis, qui survient lorsque la cellule est libérée de tout contact avec une membrane basale ou d'autres cellules⁴⁸. Ce type d'apoptose est toutefois assez rare pour les hépatocytes *in vivo* et l'étude actuelle porte sur l'apoptose conventionnelle (voir plus bas). L'action des intégrines sur le cytosquelette ne sera pas étudiée dans ce projet.

L'activation des MAPK et de toutes les autres voies de signalisation dépendantes des kinases, s'initient au niveau des points de contact focaux. À cet endroit, la FAK (focal adhesion kinase), est activée⁴⁹. La FAK est en mesure d'activer d'autres enzymes, notamment la rétroactivation d'autres FAK ainsi que des membres de la famille de la kinase Src⁵⁰. En ce qui concerne la voie d'activation des MAPK, la FAK

permet l'activation de la protéine SHC1 ou « Src homology 2 domain containing transforming protein 1 »⁵¹. Il s'en suivra la poursuite de la chaîne d'activation conventionnelle, soit la phosphorylation de la petite GTPase Ras, suivi de Raf et enfin l'activation des MEK1 et MEK2 (Map/Erk Kinase-1 and 2), qui sont les activateurs des ERK1 et ERK2 (extra-cellular responsive kinase 1 et 2)^{52,53}.

3.3 Effet cellulaire de l'activation des ERK1 et 2

Les ERK1 et 2 sont les éléments-clés de cette chaîne d'activation. Elles vont activer une panoplie d'autres kinases ainsi que plusieurs facteurs de transcription qui jouent un rôle activateur direct ou indirect sur plusieurs fonctions cellulaires^{52,53}. Le signal de la voie des MAPK est difficile à retracer suite à l'activation des ERK1 et 2 car le signal devient diffus et implique une grande variété de protéines. Les effecteurs peuvent également varier d'un type cellulaire à l'autre tandis que la série d'activation menant aux ERK1 et 2 est conservée chez tous les types cellulaires, incluant les hépatocytes.

Parmi les effets attribués aux ERK1 et 2, le plus important est leur rôle dans la progression du cycle cellulaire^{54,55}. Elles sont impliquées dans la synthèse et l'activation de la cycline D1⁵⁵. Sans leur activation, la cellule ne peut passer le point de contrôle G1/S (G1/S checkpoint) et la cellule ne pourra se diviser. Les ERK1 et 2 ont également un rôle à jouer dans la différenciation cellulaire⁵⁶. Conjointement avec d'autres signaux, elles permettent à la cellule de se développer et de se spécialiser. La différenciation et la prolifération cellulaire sont deux phénomènes qui sont souvent en opposition. Les ERK cumulent tout de même les deux fonctions à l'intérieur d'une même cellule. Cette dualité serait rendue possible par la modulation du signal. Dépendant de l'inducteur, une

isoforme différente de l'enzyme Raf sera activée. Ainsi dans la lignée neuronale PC12, l'EGF (epithelial growth factor) induit une activité des ERK de courte durée par Raf-1 et permet à la cellule de se multiplier, alors que le NGF (nerve growth factor) induit une activation soutenue des ERK par b-Raf, et pousse ainsi la cellule à compléter sa différenciation en neurone⁵⁶. En plus de ces fonctions, la voie des MAPK est reconnue comme étant un signal de survie cellulaire⁵⁷. Des mutations peuvent en effet engendrer des transformations oncogéniques. Cette voie est très largement étudiée dans le développement de médicaments contre le cancer.

4 INDUCTION DE L'APOPTOSE

4.1 La voie du récepteur Fas

L'activation du récepteur Fas par Fas-Ligand cause l'apoptose de plusieurs types cellulaires *in vivo*⁵⁸. Ce mécanisme est fréquemment impliqué à divers endroits dans l'organisme de manière physiologique afin de contrôler l'homéostasie tissulaire⁵⁹. Ce phénomène est notamment présent dans le foie au niveau des hépatocytes. En effet, le foie est un site d'expression élevée du récepteur Fas. L'activation du récepteur Fas est donc un modèle de choix dans l'étude de l'apoptose chez les hépatocytes^{60,61}. *In vitro*, il est possible de mimer l'effet de l'activation du récepteur FAS à l'aide d'un anticorps, l'anti-Fas (du clone Jo2), qui vient remplacer le ligand naturel du récepteur, et ainsi déclencher la réaction apoptotique⁵⁸. Ce même anticorps peut être utilisé *in vivo*, par injection intrapéritonéale ou intraveineuse; ce modèle entraîne une atteinte hépatique massive s'apparentant à une hépatite fulminante⁶². L'anticorps

cause en fait l'apoptose d'un nombre suffisant d'hépatocyte pour causer des dommages importants au foie. Tout dépendant de la dose injectée, ceci peut être fatal pour l'animal. La raison pour laquelle l'anticorps est plus efficace *in vivo* n'est pas très claire. L'expression de certaines protéines est certainement différente entre la culture cellulaire et le foie *in vivo*. Aoki *et al* a démontré que le FasL pouvait se lier à la fibronectine et ainsi augmenter sa biodisponibilité⁶³. Ces implications expliquent partiellement la sensibilité accrue au Fas *in vivo*, mais la vraie explication se situerait plutôt dans une somme de facteurs, puisqu'il est impossible de recréer complètement l'environnement normal des hépatocytes *in vitro*.

4.2 La voie du TNF- α

Le récepteur du TNF- α déclenche l'apoptose de la même manière que le récepteur Fas par l'activation du récepteur TNFR1⁶⁴. Le TNF- α est toutefois moins efficace à induire l'apoptose. *In vitro*, lorsque employé seul, le TNF- α ne parvient pas à déclencher l'apoptose des hépatocytes. Il nécessite l'ajout d'un bloqueur de transcription, comme l'actinomycine D⁶⁵. Outre son rôle de bloqueur de la transcription, l'actinomycine D inhibe l'expression de FLICE⁶⁶ ou « FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme ». C'est un inhibiteur de la transmission du signal apoptotique entre le récepteur de mort cellulaire, comme le récepteur Fas ou le récepteur TNFR1, et la machinerie intracellulaire. L'action conjointe du TNF- α et de l'actinomycine D déclenche l'apoptose des hépatocytes. *In vivo*, on peut recourir à l'administration du TNF- α et d'un inhibiteur de la transcription, la camptothécine, agissant de façon similaire à l'actinomycine D⁶⁷.

4.3 Déroulement de la réaction apoptotique

Pour faciliter la compréhension de la présente section, la figure 2 (page 18) illustre un exemple du déroulement de la réaction apoptotique.

4.3.1 Caspases activatrices

Suite à l'activation du récepteur de mort cellulaire, soit le récepteur Fas, le récepteur TNFR1 ou tout autre récepteur pouvant déclencher l'apoptose, la réaction apoptotique devient éventuellement commune à tous les récepteurs. Le premier élément de la réaction intracellulaire se situe à la partie cytosolique des récepteurs de mort cellulaire. Ces récepteurs comportent tous un domaine de mort (Death Domain) sur leur segment intracellulaire⁶⁸. Le récepteur activé recrute la caspase-8 et l'active par auto-clivage⁶⁹. La molécule FLICE, influencée par la présence d'actinomycine D, est un inhibiteur compétitif du recrutement de la caspase-8⁶⁶. Lorsque suffisamment de récepteurs de mort cellulaire sont activés pour être en mesure d'initier la cascade des caspases, la réaction apoptotique peut alors se propager. Les caspases sont en mesure de cliver plusieurs types de protéines, que ce soit pour activer d'autres caspases ou pour « détruire » certains éléments de la cellule, comme les lamines nucléaires, afin de procéder à la mort cellulaire. La caspase-8 fait partie de la sous-famille des caspases activatrices (ou initiatrices)⁷⁰. Elle a un nombre limité de cibles et ne peut compléter la réaction apoptotique à elle seule. La caspase-8 peut activer directement des caspases effectrices comme la caspase-3. Lorsque ceci est suffisant à la poursuite de la réaction apoptotique, la cellule est dite de type 1. Par contre, chez plusieurs cellules, dont les hépatocytes, ceci n'est pas suffisant. Le signal apoptotique nécessite une amplification du signal en passant par la mitochondrie⁷⁰. Dans ces cas, il s'agit de cellule de type 2. Le substrat principal de la caspase-8 dans ce type de cellule est la protéine Bid⁷¹.

4.3.2 Protéines de la famille Bcl-2

La protéine Bid fait partie de la famille des protéines Bcl-2 et est inactive à l'état normal. Les protéines de la famille Bcl-2 sont reconnaissables par la présence de domaines spécifiques de BH1 à BH4 (Bcl-2 homology domain 1 to 4)⁷². Cette famille de protéines est responsable du contrôle et de la propagation du signal apoptotique. Elle comporte des éléments anti-apoptotiques comme les protéines Bcl-x_L et Bcl-2, et d'autres pro-apoptotiques dont les protéines Bax et Bid⁷³. Plusieurs éléments pro-apoptotiques ne comportent que des domaines BH3 (BH3-only). Ces protéines seront généralement dirigées vers la mitochondrie pour venir déstabiliser l'équilibre de la membrane mitochondriale⁷⁴. C'est le cas de la protéine Bid. Lorsque activée par la caspase-8, elle devient la molécule tBid (Bid tronquée)⁷⁵. tBid est ensuite transloquée vers la mitochondrie où elle déstabilise les autres protéines de la famille Bcl-2, telle la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. Cette dernière réside au niveau de la mitochondrie et a pour effet de stabiliser l'intégrité de la membrane mitochondriale face aux éléments pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. La protéine Bax est normalement cytosolique, mais l'activation de Bid activera sa translocation vers la mitochondrie. Son niveau d'expression, et donc de translocation, viendra donc influencer sur la continuité de la réaction apoptotique⁷⁶. Lorsque le ratio des protéines pro- vs anti-apoptotique favorise la poursuite de la réaction, la protéine Bax se polymérise et forme des pores à travers la membrane mitochondriale, appelé mégapore mitochondriale⁷⁷. Cela a pour effet de causer une perte du matériel se situant normalement dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Les pertes ne se font pas uniquement au travers du canal créé entre autres par Bax, mais aussi par diverses autres méthodes découlant de la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale, donc de la dépolarisation de cette même membrane⁷⁸. Plusieurs éléments nécessaires à la poursuite de la réaction apoptotique proviennent de ses fuites.

4.3.3 Activation des caspases effectrices

Parmi les éléments qui s'échappent de la mitochondrie, le plus important est le cytochrome C⁷⁹. Celui-ci, lorsque relargué par la mitochondrie, s'associe à l'Apaf-1 (apoptose protease activating factor), pour recruter plusieurs caspases-9 et aussi pour former l'apoptosome⁸⁰. L'apoptosome est un complexe protéique servant à l'amplification du signal et à l'activation d'un maximum de caspases effectrices, notamment les caspases-3. La mitochondrie laisse aussi échapper d'autres éléments importants comme la protéine Diablo/Smac⁸¹. Il existe dans le cytosol des IAP (inhibitor of apoptosis) qui permettent d'inhiber l'action des caspases activées. La protéine Diablo/Smac vient bloquer l'action des IAP pour permettre au signal de se propager.

Enfin, une fois les caspases effectrices activées, la réaction apoptotique tire à sa fin. L'enzyme-type de celles-ci est la caspase-3. Malgré qu'elle soit spécifique à une séquence d'acides aminés précise, (DEVD⁸² : acide aspartique, acide glutamique, valine, acide aspartique), elle possède plusieurs cibles dans la cellule. L'activité des caspases effectrices fait des ravages à l'intérieur de la cellule et mène à l'aboutissement final de l'apoptose, soit la formation des corps apoptotiques ou « blebbing » en s'attaquant entre autres à certains éléments du cytosquelette⁸³. Ceci permet de former les corps apoptotiques qui sont phagocytés par les cellules avoisinantes et d'ainsi éviter en partie la réaction inflammatoire.

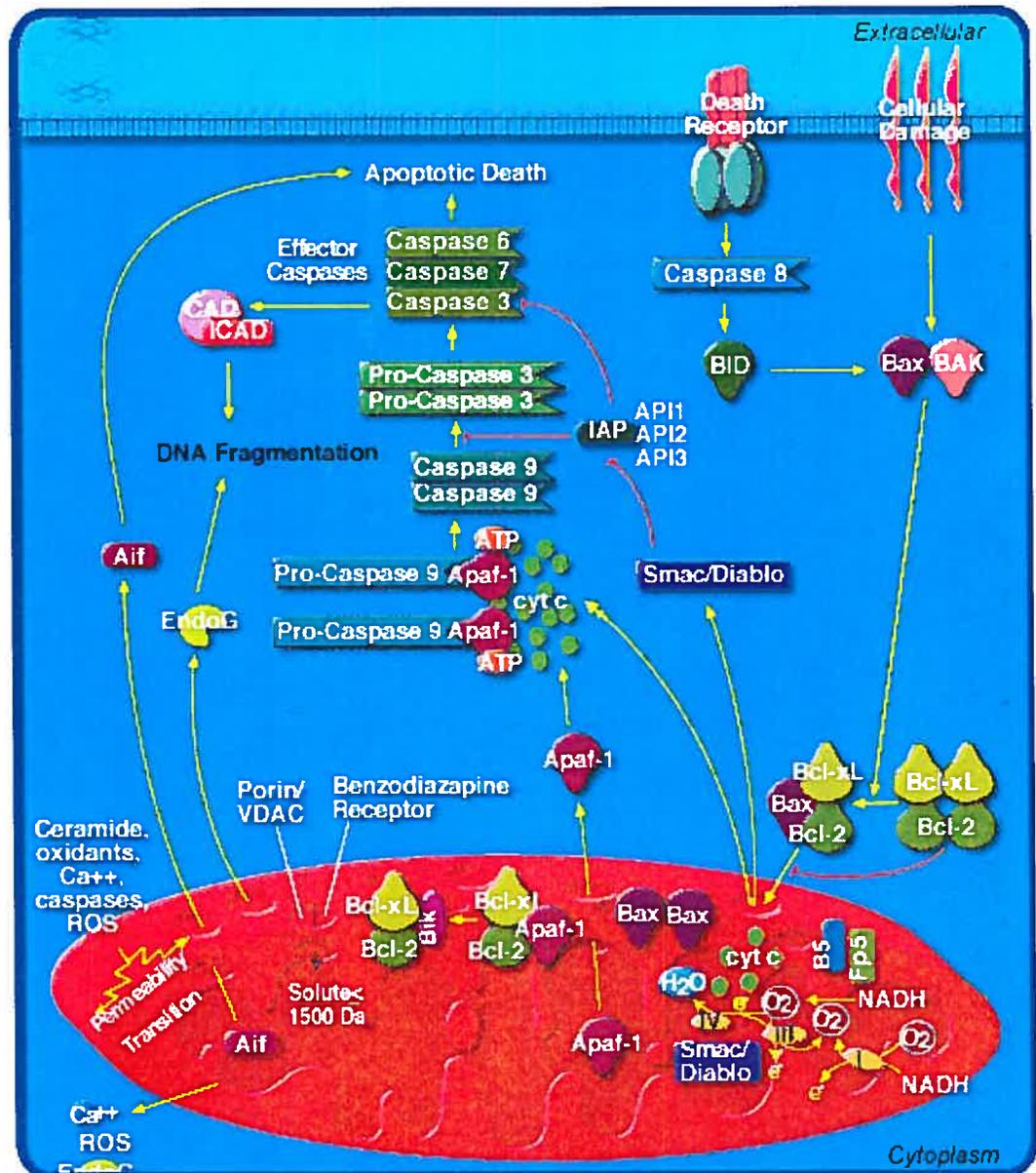


Figure 2 : La réaction apoptotique chez les hépatocytes. Exemple de chaîne de réaction menant à l'apoptose des hépatocytes. Gracieuseté de Biocarta : http://www.biocarta.com/pathfiles/h_mitochondriaPathway.asp

5 RELATION ENTRE LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE ET L'APOPTOSE

5.1 Résistance des hépatocytes à l'anoïkis par l'activation d'une intégrine

Plusieurs publications ont démontré que l'activation d'une intégrine permettait à une cellule, hépatocyte ou autre, de résister à l'apoptose. Pour les hépatocytes, la plupart de ces publications utilisent des moyens artificiels ou indirects d'activation des intégrines. Certains ont transfecté et surexprimé la sous-unité β_1 ⁸⁴, d'autres ont utilisé un anticorps contre cette même sous-unité pour l'activer⁸⁵. Enfin, certains ont utilisé de courts segments peptidiques, les fragments RGD⁸⁶, présents sur plusieurs éléments de la matrice extracellulaire, notamment la fibronectine, pour activer encore une fois la sous-unité β_1 . La majorité de ces études ont identifié la voie des MAPK comme étant responsable de cette protection. Ces études se ressemblent aussi par le mode d'induction de l'apoptose. Certaines analysent l'apoptose spontanée sans activation de récepteur de mort cellulaire, et les autres induisent l'apoptose par perte d'ancrage de la cellule à un substrat matriciel ou physique. Pour ces derniers cas, on parle d'anoïkis et non d'apoptose conventionnelle.

Plusieurs publications ne font pas la distinction entre l'anoïkis et l'apoptose traditionnelle, induite par un récepteur de mort cellulaire. L'anoïkis est plutôt inhabituelle chez les hépatocytes *in vivo*⁴⁸. Il est effectivement rare que les hépatocytes sains se détachent du tissu hépatique pour se retrouver dans la circulation sanguine ou lymphatique. Par opposition, ceci est fréquent chez les cellules formant l'épithélium gastrique ou intestinale⁸⁷, car elles sont soumises à des pressions mécaniques continues amenant certaines cellules à se détacher de leur

environnement⁸⁸. La résistance à l'anoïkis est également importante pour les cellules cancéreuses se détachant de la tumeur car ceci leur permet d'aller s'implanter ailleurs et de former des métastases⁸⁹. Il est donc important de distinguer l'apoptose de l'anoïkis. L'apoptose peut être induite par un récepteur de mort cellulaire⁶⁰ ou parfois par la privation de facteur de croissance⁹⁰, alors que l'anoïkis est un phénomène lié directement à la perte d'ancrage de la cellule à son environnement⁴⁸ et implique des éléments liés à son cytosquelette, comme les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bim⁹¹ et Bmi⁹². Malgré le fait que les deux phénomènes sont semblables en fin de parcours, l'initiation du signal de mort cellulaire diffère, ce qui permet de caractériser les deux processus comme étant des réactions différentes.

5.2 Résistance à l'apoptose par l'activation d'une intégrine

Certaines études ont tout de même démontré que les intégrines pouvaient avoir un effet protecteur sur l'apoptose conventionnelle. Gendron *et al* ont démontré que le collagène de type I pouvait protéger les lymphocytes T de l'apoptose, suite à une stimulation du récepteur Fas, par une activation des MAPK par l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ⁹³. Des études similaires ont également été faites sur des cellules Jurkat par Aoudjit et Vuori⁹⁴.

Une étude de Zhang *et al* a pu démontrer l'implication de la sous-unités β_1 dans la protection de lignées provenant de cancer hépatocellulaire, Hep3B et Huh7, contre l'apoptose⁹⁵. Une surexpression de ce fragment d'intégrine stimule la voie des MAPK, ce qui protège les cellules de l'apoptose induite par le TGF- β (transforming growth factor β).

6 PRÉMISSSES ET HYPOTHÈSE

Notre équipe étudie depuis longtemps l'apoptose des hépatocytes et les facteurs qui l'influencent. L'apoptose est le mode de mort cellulaire le plus prévalent pour les hépatocytes et est donc impliquée dans plusieurs pathologies. Nous utilisons le collagène de type I dans nos cultures d'hépatocytes primaires depuis longtemps dans le seul but de favoriser l'attachement des cellules. Nous avons aussi remarqué que les hépatocytes se déploient mieux en présence de collagène. Le collagène est donc régulièrement utilisé dans nos études portant sur l'apoptose, ou sur tout autre sujet, sans toutefois connaître ses implications.

Le collagène est une composante importante du foie. Il est indispensable au maintien de sa structure. De plus, la plupart des pathologies chroniques du foie viennent à causer une fibrose, donc une augmentation considérable de la teneur du foie en collagène. Les fibres de collagène qui sont ainsi formées sont considérées comme du tissu cicatriciel secondaire à l'atteinte hépatique, donc un processus de défense de l'organisme. Cependant, la présence de collagène est considérée comme un élément nocif et cliniquement, on cherche à l'éliminer.

Nous croyons que l'organisme n'aurait pas développé un tel processus si celui-ci lui était nuisible. Nous émettons l'hypothèse que le collagène de type I présent dans la fibrose du foie protège au moins partiellement les hépatocytes de l'apoptose en intervenant au niveau des protéines responsables de la réaction apoptotique, soient les membres de la famille Bcl-2 et les caspases, et ce tant *in vitro* que *in vivo*. D'autres éléments de la matrice extra-cellulaires, comme la fibronectine pourrait également avoir un effet sur l'apoptose. De plus, il est nécessaire d'identifier une voie de signalisation cellulaire pour justifier les variations dans l'expression des protéines et de l'activité des caspases. Afin de valider nos observations *in vitro*, un modèle *in vivo* de fibrose hépatique par injections de thioacétamide sera utilisé.

Matériel et Méthodes

1 MATÉRIEL

Le tampon HEPES et l'albumine bovine sérique (BSA) proviennent de chez Roche (Laval, QC). L'anti-FAS, la caspase-3 recombinante ainsi que les inhibiteurs de voies métaboliques ont été achetés chez Cell Signaling (Beverly, MA). L' EGF et le collagène de type I proviennent de chez BD Biosciences (Mississauga, ON). Les substrats de caspase fluorogénique proviennent de chez Mediacorp (Montréal, QC). Le milieu L-15, le Glutamax® et la Pénicilline/Streptomycine ont été achetés chez GIBCO (Burlington, ON). Les réactifs pour électrophorèse ont été produits par Bio-Rad (Hercules, CA). Le sodium dodecyl sulfate (SDS) et le Tris proviennent de chez Invitrogen (Burlington, ON). Tous les autres réactifs proviennent de chez Sigma (Oakville, ON) sauf lorsque spécifié autrement.

2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

2.1 Animaux

Des souris mâles de souche Balb/C de 49 jours (Charles River, St-Constant, QC) ont été utilisées pour les études *in vitro*. Les études *in vivo* ont été effectuées sur des souris de même souche âgées de 30 jours. Elles ont eu accès à de la nourriture de type Chow et à de l'eau *ad libitum*. Elles ont été soumises à des cycles de lumière/noirceur de 12h. Pour les études impliquant des souris transgéniques ERK1-/- ou leur contrôle de type sauvage, des souris de souche CD-1 ont été utilisées. Celles-ci nous ont été fournies par le D^r Sylvain Meloche de l'Université de Montréal. Les souris utilisées ont été traitées selon les protocoles acceptés par le Comité institutionnel de protection des animaux du centre de recherche du CHUM.

2.2 Isolation d'hépatocytes

Les hépatocytes ont été isolés à partir de la technique de perfusion de collagénase telle que décrite par Mussalam *et al*⁸². Brièvement, les animaux ont tout d'abord été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (Somnotol, McGill Animal Resources Center, Montréal, QC) à 400mg/kg de poids corporel. La cavité abdominale a ensuite été ouverte et une perfusion *in situ* du foie par une canulation de la veine porte à l'aide d'une aiguille de taille 23 3/4G a été effectuée. Un tampon HEPES à pH 7.6 a tout d'abord été perfusé pendant 4 minutes pour vider le foie de son sang. Une solution de collagénase de type IV (Worthington, Lakewood, NJ) à 50mg% dans le même tampon HEPES, additionné de 1.2mg/L de CaCl₂ (activateur de la collagénase) a ensuite été perfusée pour une durée de 7 à 8 minutes. Le débit est maintenu à 7ml/minute à une température de 37°C. Le foie a ensuite été prélevé et transféré dans un milieu Leibovitz-15 (L-15) additionné d'albumine bovine sérique à 0.2% à pH 7.6.

2.3 Mise en culture

Le foie digéré est dissocié dans le milieu L-15. Les cellules sont passées dans un filtre de nylon de 74µm et récoltées dans un tube de plastique stérile. Trois centrifugations successives de 72g sont effectuées pour éliminer les cellules mortes. Un décompte cellulaire selon la méthode d'exclusion au bleu de Trypan est ensuite effectué. Une viabilité d'au moins 80% a été requise pour la mise en culture.

Les hépatocytes ainsi obtenus ont ensuite étéensemencés dans des pétris de 100mm de diamètre à une densité de 26 000 cellules par cm² dans un milieu de culture Williams'E à pH 7.2, sans sérum, additionné

de Pénicilline/Streptomycine à 100 000U/L et de Glutamax® à 2 μ M. Lors d'études de mesure d'apoptose par coloration de la chromatine, des pétris de 35mm ont été utilisés mais la densité cellulaire demeure la même. Les cellules ont alors été placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Une période de deux heures est allouée aux hépatocytes pour s'attacher aux pétris avant de changer le milieu de culture et d'y ajouter les différents réactifs.

2.4 Préparation des différentes matrices extracellulaires

Pour la préparation des pétris de collagène, une solution d'acide acétique 0.02N additionnée de collagène de type 1 a été préparée puis déposée dans les pétris pour une durée de 2 heures sous la hotte. Sauf lorsque spécifié, le collagène estensemencé à une concentration finale de 13.9 μ g/cm². Les pétris sont ensuite lavés au PBS 1X (phosphate buffered saline) et séchés à l'air libre. Ces pétris peuvent être conservés pendant 12 mois dans la noirceur à 4°C.

Les pétris sur lit de fibronectine doivent quant à eux être préparés fraîchement avant chaque expérience. Pour ce faire, une solution à partir de fibronectine concentrée à 0.1% a été préparée dans du milieu Williams E et laissée reposer dans les pétris au moins une heure avant l'ensemencement des cellules. Sauf lorsque précisé, les pétris sontensemencés de fibronectine à 5 μ g/cm².

3 ANALYSES CYTOLOGIQUES

3.1 Quantification de l'apoptose par coloration de la chromatine

Suite à la période d'attachement, les milieux de culture ont été remplacés et l'anticorps anti-FAS de clone Jo2 a été ajouté à une concentration de 250ng/ml⁸². Après 6 heures d'incubation, les cellules sont fixées à la formaline 5% (Fisher, Napean, ON) pendant 20 minutes à température pièce. Trois lavages successifs au PBS 1X ont ensuite été effectués et les pétris ont été laissés à sécher. Pour la coloration au Hoechst 33258, les pétris ont été réhydratés au PBS 1X puis une solution contenant le colorant à 0.25µg/ml dans du PBS 1X a été ajouté pour 15 minutes à la noirceur. Enfin, les pétris ont été lavés trois fois à grande eau et séchés complètement à la noirceur.

Dans certains cas, des inhibiteurs spécifiques des voies métaboliques ainsi que l'EGF ont été utilisés afin de caractériser les effets de ces mêmes voies métaboliques dans l'effet protecteur du collagène sur l'apoptose des hépatocytes. Les inhibiteurs utilisés ont été le PD98059 à 20µM et le U0126 à 25µM comme inhibiteurs des MEK1/2⁹⁶, et le LY294002 à 40µM comme inhibiteur de l'activation de l'AKT⁹⁶. L'EGF a, quant à lui, été utilisé à 50ng/ml comme activateur non spécifique de la voie des ERK. Les cellules en cultures ont été préincubées avec les inhibiteurs ou l'EGF pendant 1 heure avant d'être exposées à l'anti-FAS. Les inhibiteurs ainsi que l'EGF étaient également présents dans le milieu lors de la stimulation à l'anti-FAS.

Dans certaines expériences, l'anticorps anti-FAS a été substitué par le TNF- α (Peprotech, Rocky Hill, NJ) ainsi qu'un bloqueur de la

transcription, l'actinomycine D (ActD) (Amersham, Baie D'Urfé, QC). Suite à la période d'attachement, une période de préincubation à l'ActD à 10nM de 30 minutes à a été effectuée. Le milieu a ensuite été remplacé par du Williams'E contenant de l'ActD à la même concentration et du TNF- α à 25ng/ml. Le calcul de l'index apoptotique a alors été fait après 20 heures d'incubation.

La quantification de l'apoptose par coloration nucléaire est possible grâce à la condensation et la fragmentation de la chromatine. Les différentes étapes de l'apoptose sont identifiables suite à une coloration nucléaire au Hoechst 33258 (figure 3). Les hépatocytes sont considérés comme apoptotiques lorsque la chromatine est soit condensée ou fragmentée. La quantification s'est faite par décompte cellulaire en microscopie à fluorescence (BX50F, Olympus Optical Co, Japon) à une excitation à 355nm et une émission à 465nm. L'index apoptotique est obtenu par le ratio de noyaux apoptotiques sur un total d'au moins 400 noyaux. Les noyaux condensés sont considérés comme apoptotiques.

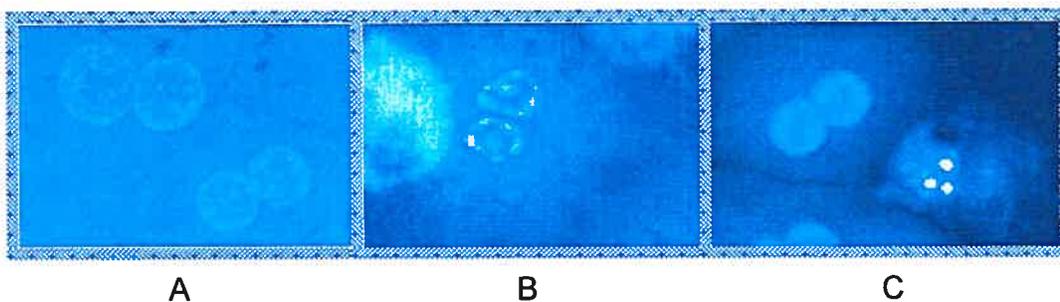


Figure 3 : Exemple de coloration au Hoechst 33258 d'hépatocytes de souris en culture primaire. Les cellules ont été soumises à l'anti-Fas [250ng/ml] pendant 6h et ont ensuite été fixées à la formaline 5% puis colorées au Hoechst 33258. La morphologie du noyau permet de distinguer les cellules apoptotiques. A) Hépatocytes normaux. B) Condensation de la chromatine. C) Fragmentation nucléaire.

4 ÉTUDES *IN VIVO*

4.1 Injection de thioacétamide

Une solution de thioacétamide 2% dans une solution saline physiologique 0,9% a été injectée par voie intra-péritonéale, à l'aide de seringue munie d'une aiguille de 28½G, à des souris Balb/C mâles de 30 jours pendant 12 semaines, à raison de trois fois par semaine à une concentration de 200µg de thioacétamide par gramme de poids corporel²⁹, pour un volume d'injection d'environ 200µl. Les souris contrôles n'ont reçu que la saline dans les mêmes volumes. Un premier groupe de souris a été sacrifié après les trois mois de traitement alors qu'un deuxième groupe a été sacrifié deux semaines après la fin des injections afin d'étudier leur récupération. Enfin, un dernier groupe de souris a été sacrifié après uniquement un mois de traitement à la thioacétamide.

4.2 Injection d'anti-FAS et sacrifice des souris

Certaines souris ayant subi le traitement fibrogénique ou son contrôle ont été sacrifiées sans injection de FAS afin d'analyser l'effet de la fibrose sur le tissu hépatique. Pour les autres, des injections d'anti-FAS à 0.5µg/g⁶² ont été effectuées. Les souris étaient ensuite sacrifiées 3h ou 6h après l'injection d'anti-FAS. Cette injection étant mortelle pour certaines souris avant la limite de 6h, le prélèvement du foie était alors effectué à l'atteinte d'un point limite, donc juste avant leur décès.

Avant les sacrifices, les souris étaient tout d'abord anesthésiées par inhalation de 5% d'isoflurane (Baxter Corp, Mississauga, ON) , avec maintien à l'isoflurane 2%. Une fois endormies, une ponction cardiaque

était alors effectuée avec une seringue à tuberculine munie d'une aiguille de 25 5/8 G. Le foie était ensuite prélevé et une petite section était plongée dans une solution de conservation histologique Tissufix™ (Chaptec, Montréal, QC). Le reste du foie était ensuite plongé immédiatement dans l'azote liquide afin de préserver l'état du foie. Les échantillons étaient ensuite conservés à -80°C

4.3 Dosage de l'alanine-aminotransférase (ALT) sérique

Les échantillons de sang prélevés sur les souris lors de leur sacrifice ont été utilisés pour doser l'alanine transférase. Cette enzyme est normalement séquestrée à l'intérieur des hépatocytes mais est relâché lorsqu'il y a lyse de la cellule, comme lors de nécrose conventionnelle ou de nécrose post-apoptose massive. Pour ce faire, le sang était d'abord laissé à la température de la pièce pendant 30 minutes pour lui permettre de coaguler. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 6000g pendant 10 minutes. Le sérum était ensuite récupéré et transféré dans un nouveau tube. Les dosages de l'ALT ont été effectués par le service de biochimie de l'hôpital St-Luc du CHUM sur les sérums obtenus à l'aide d'un multi-analyseur automatisé.

5 MESURES DE FIBROSE

5.1 Coloration au rouge Sirius

Des lames histologiques ont été obtenues à partir des échantillons de foie prélevés lors des sacrifices. Certaines lames ont été colorées au rouge Sirius, qui colore les fibres de collagène¹⁵. Les coupes histologiques ainsi que les colorations ont été effectuées par le département de pathologie de l'hôpital St-Luc du CHUM. Les lames colorées au rouge Sirius ont ensuite été analysées par le D^r Bich Nguyen, pathologiste, selon la méthode semi-quantitative élaborée par Ishak¹⁵ (tableau 1). D'autres lames histologiques ont été produites et coloré à l'hématoxyline – phloxine – safran afin de pouvoir analyser l'état du foie suite aux injections d'anti-FAS.

Tableau 1 : Évaluation de la fibrose par score de Ishak

Score de Ishak	
Changement architectural	Score
Pas de fibrose	0
Expansion fibreuse dans certaines zones portales, avec ou sans courts septa fibreux	1
Expansion fibreuse dans la plupart des zones portales, avec ou sans courts septa fibreux	2
Expansion fibreuse dans la plupart des zones portales, avec ponts occasionnels entre zones portales	3
Expansions fibreuses des zones portales, avec ponts fréquents entre zones portales ou zone portale à zone centrale	4
Pont fréquent (entre zones portales et/ou de zones portales à zone centrales) avec nodule occasionnels (cirrhose incomplète)	5
Cirrhose complète et définitive	6

Traduction libre de Histological grading and staging of chronic hepatitis. Journal of Hepatology, 1995, 22, 696-699.

5.2 Dosage de l'hydroxyproline

Une adaptation de la méthode de Kivirikko *et al*⁸⁷ et Nagatani *et al*⁸⁸ tel que suggéré par Sakaida *et al*⁸⁹ a été utilisée pour doser l'hydroxyproline. Environ 20mg des échantillons de foie ont été plongés et dissouts dans du HCl 6M (Anachemia, Lachine, QC) et autoclavés à 110°C pendant 18 heures. Le volume d'acide a été ajusté à 0.125ml de HCl par mg de foie selon le poids de l'échantillon à dissoudre. Après avoir centrifugé les échantillons à 3000g à 4°C, 2ml de la solution ont été prélevés et neutralisés avec du KOH 8N additionné de 1% de phénolphtaléine. Deux ml de cette nouvelle solution ont été récupérés et 2g de KCl et 1 ml de borate 0,5M à pH 8.2 y ont été ajoutés. Le tout a été agité pendant 15 minutes à température pièce et agité de nouveau 15 minutes sur la glace. Un ml de chloramine-T à 0.2M a été ajouté et la nouvelle solution a été agitée sur la glace pendant 1 heure. Ensuite, 2 ml de thiosulfate de sodium à 3.6M ont été ajoutés avant d'incuber les échantillons pendant 30 minutes à 120°C dans un four pasteur. Enfin, 3 ml de toluène ont été ajoutés et le tout a été agité par inversion pendant 20 minutes à température pièce. Après une centrifugation, 2ml de la phase de toluène ont été prélevés dans un nouveau tube. Pour finir, 800µl de réactif de Ehrlich ont été ajoutés avant d'attendre 30 minutes en agitant de temps à autres. La lecture de l'absorbance de la phase inférieure se fait à 560nm et est ramenée sur une courbe standard d'hydroxyproline afin d'obtenir un résultat en microgramme d'hydroxyproline par gramme de foie.

6 ANALYSES DES PROTÉINES

6.1 Mesure d'activité protéase de la caspase-3

Des mesures d'activités caspases ont été effectuées sur des cultures primaires d'hépatocytes de souris ainsi que sur des homogénats des foies soumis au traitement fibrogénique. Pour les études *in vitro*, les cellules étaient soumises à l'anti-FAS durant différents temps d'incubation au bout desquelles les cellules étaient prélevées mécaniquement dans du PBS 1X, puis centrifugées pour être incubées 15 minute sur la glace dans un tampon de lyse (HEPES 10mM à pH 7,4, KCl 42mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1nM, 1% Triton-X et 0.1% CHAPS). Juste avant l'utilisation, 1mM de dithiothréitol (DTT), 1mM de phénylméthylsulfonylfluoride et un cocktail d'inhibiteur de protéases (10µg/ml de leupeptine, 10µg/ml d'aprotinine, 10µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja et 100mM de benzamidine) étaient ajoutés au tampon de lyse. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 13000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant était récolté et conservé à -80°C jusqu'au dosage.

Les protéines ont ensuite été dosées selon la méthode de Bradford¹⁰⁰. L'activité caspase-3 est mesurée par le clivage d'un substrat spécifique fluorogénique (Ac-DEVD-AMC) à 100mM dans 40 µl du tampon de lyse contenant 100µg de protéines. Cinquante µl de tampon de réaction (HEPES 100mM à pH 7.2, CaCl 200mM, EDTA 2mM, sucrose 20% et CHAPS 0.2%) et 10µl de DTT à 100µM étaient par la suite ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 10 minutes à 37°C à la noirceur. La mesure du clivage du substrat fluorogénique se fait à l'aide d'un spectrofluoromètre à microplaque SpectraMax Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) avec une excitation à 380nm et une

émission à 460nm. Le taux de clivage maximal a été analysé à l'aide du programme Softmax Pro (Molecular Devices) et a été normalisé sur une courbe de caspase-3 recombinante humaine. Le même procédé a été effectué pour l'analyse de l'activité de la caspase-8. Seul le substrat (Ac-IETD-AMC) était différent et un échantillon de 200µg de protéines était requis.

Pour ce qui est des études sur foie entier, les morceaux de foie ont été homogénéisés dans 3µl de tampon de lyse par mg de foie avant de subir le même traitement que les cellules en culture.

6.2 Électrophorèse et transfert sur membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF)

Des analyses protéiques ont été effectuées sur des hépatocytes primaires ainsi que sur des homogénats de foie des souris ayant été traitées à la thioacétamide ou à la saline. Dans le cas des hépatocytes primaires, les cellules étaient récoltées mécaniquement dans du PBS 1X, puis centrifugées à 3000g à 4°C. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans un tampon RIPA (1% Igepal CA-630, 0.5% deoxycholate de sodium, 0.1% SDS, 10µg/ml leupeptine, 10µg/ml aprotinine, 10µg/ml inhibiteur de trypsine de soja et 100mM benzamidine). Les protéines ont également été dosées selon la méthode de Bradford. Cent vingt-cinq µg de protéines ont été diluées pour arriver à un volume total de 12µL auxquels 12 µl de tampon de Laemmli 2X (Tris 0.1M à pH 6.8, SDS 4%, Glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 4% et 0.5mg/ml de bleu de bromophénol sur base d'eau) a été ajouté. Vingt µl du produit final, donc 100µg de protéines, ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE 15% à 45 volts durant la nuit. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Pall, St-Laurent, QC) par

Transblot® à 25 volts durant la nuit. L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration au rouge ponceau (0.1g de rouge ponceau dans de l'acide acétique 5%). Pour l'analyse de l'expression des protéines BAX et Bcl-X_L, seulement 30µg de protéines ont été requis.

Pour les analyses sur foie entier, 3µl de tampon RIPA par mg de foie était utilisé pour homogénéiser les échantillons et la même procédure a été appliquée.

6.3 Immunobuvardage

Les membranes de PVDF ont tout d'abord été bloquées durant une heure dans du lait écrémé 10% additionné de Tween 0.05% à température pièce avec agitation. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire (voir tableau 2) dans une solution de lait à 1% pendant la nuit à 4°C avec agitation. Trois lavages successifs de 10 minutes au PBS 1X additionné de Tween 0.05% ont ensuite été effectués avant d'incuber l'anticorps secondaire lié à la peroxydase de Raifort (voir tableau 2). Cette incubation dure 1 heure dans du lait 5% à température pièce dans un four à hybridation. La liaison des anticorps est ensuite détectée par chemiluminescence (PE Bioscience, Woodbridge, ON) sur film Kodak (Toronto, ON) et les bandes ont été analysées par densitométrie par le programme informatique Collage®. Chaque bande a ensuite été comparée à une mesure de l'expression de l'actine pour s'assurer de l'homogénéité de la charge de chaque condition étudiée.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés

Protéine	Anticorps primaire		Anticorps secondaire			PM (kDa)
	Fournisseur	concentration	Type	Fournisseur	concentration	
Actine	Calbiochem	1:5000	Anti-souris IgM	Calbiochem	1:10000	42
Bax	Santa Cruz	1:500	Anti-lapin	BD biosciences	1:10000	23
Bcl-xL	BD biosciences	1:1000	Anti-souris	BD biosciences	1:10000	26
Bid	R&D Systems	1:500	Anti-rat	Cedarlane	1:5000	23 et 15
p-ERK	Cell Signalling	1:1000	Anti-souris	BD biosciences	1:10000	44 et 42

Calbiochem (San Diego CA), Santa Cruz (Santa Cruz, CA) BD Biosciences (Mississauga, ON) R&D Systems (Minneapolis, MN), Cedarlane (Hornby, ON), Cell Signaling (Beverly MA)

6 STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques consistent en des tests de t. Elles ont été effectuées à partir du logiciel informatique Instat®. Des valeurs de *P* inférieur à 0.05 ont été considérées comme significatives.

Résultats

1 EFFET DES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SUR L'APOPTOSE DES HÉPATOCTES

1.1 Effet du collagène

L'ajout de l'anticorps anti-Fas déclenche l'apoptose des hépatocytes. Six heures après l'ajout du Fas, la réaction apoptotique est assez avancée pour que l'on puisse la quantifier par coloration nucléaire. Il est alors possible de distinguer une variation de l'effet apoptotique du Fas entre la culture sur plastique ou sur lit de collagène. En effet, la figure 4 démontre un effet protecteur du collagène [$13.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$] comparativement à une culture contrôle sur plastique ($8.75 \pm 3.01\%$ vs $15.75 \pm 4.07\%$, après 6h de stimulation au Fas, $P < 0.001$). Cet effet protecteur du collagène se prolonge dans le temps entre 2 et 8 heures (figure 5) et est influencé par la concentration du collagène fixé sur les pétris, selon une courbe dose-réponse entre 0.02 et $139\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (figure 6).

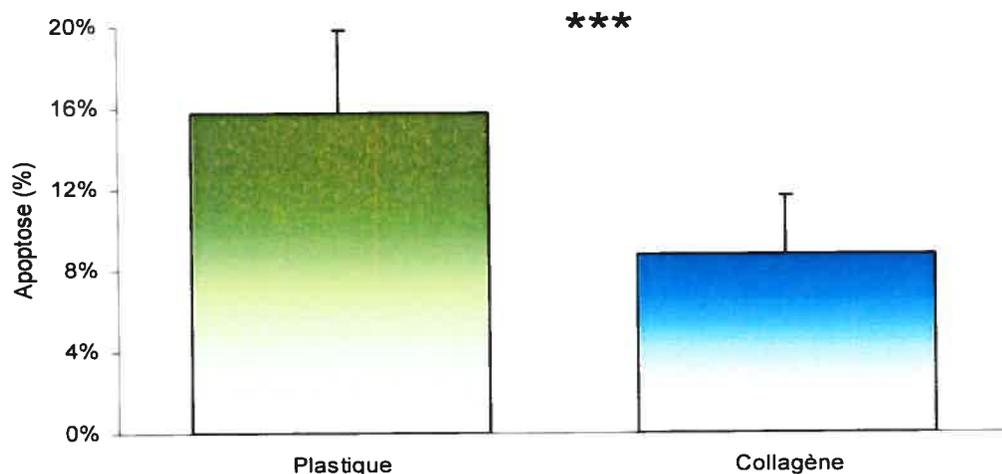


Figure 4 : Effet du collagène de type I sur l'apoptose des hépatocytes
 Index apoptotique de culture d'hépatocytes primaires sur collagène et sur plastique en présence d'anti-Fas [250 ng/ml] durant 6h. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% et colorées au Hoechst 33258.

*** $P < 0.001$, $n=9$

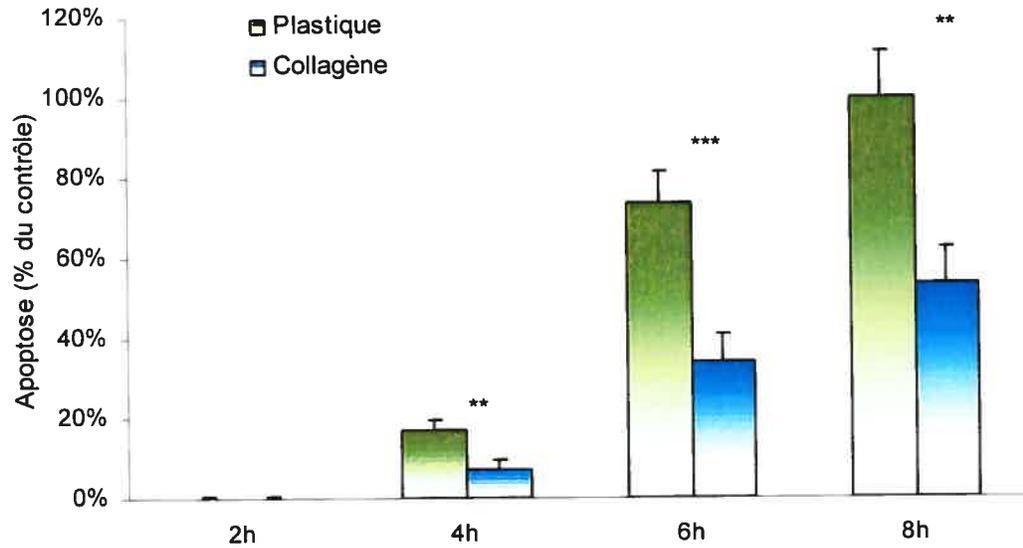


Figure 5 : Effet du collagène sur l'apoptose des hépatocytes dans le temps. Les hépatocytes de souris en culture primaire ont été soumis à l'anti-Fas [250ng/ml] et ont été fixés après 2 à 8 heures de stimulation en présence ou non de collagène. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% puis colorées au Hoechst 33258. Les résultats sont exprimés par rapport à une culture contrôle sur plastique soumise à la stimulation Fas durant 8h.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$

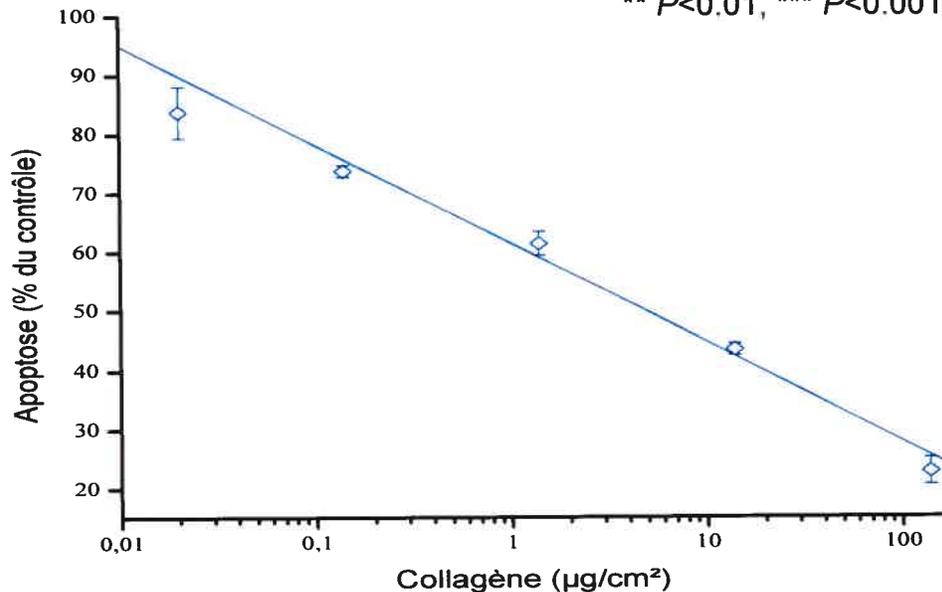


Figure 6 : Effet de la concentration de collagène sur l'apoptose. Courbe dose-réponse du collagène de type I comparativement à une culture sur plastique (contrôle). Les hépatocytes primaires ont été soumis à l'anti-Fas [250 ng/ml] pendant 6h, puis fixés à la formaline 5% et colorés au Hoechst 33258.

$n = 3$

1.3 Protection du collagène contre l'apoptose induite par l'actinomycine D et le TNF- α

L'effet protecteur du collagène de type I n'est pas uniquement perceptible sur des cultures d'hépatocytes en présence d'activateur de la voie du Fas. La figure 7 présente le même effet de protection du collagène observé sur des cultures soumises à une autre voie d'activation de la réaction apoptotique, soit celle du TNF- α . Les hépatocytes soumis à une préincubation à l'actinomycine D, un bloqueur de la transcription, suivi d'un traitement conjoint à l'actinomycine D et au TNF- α ont démontré la même protection contre l'apoptose ($100\pm 10.2\%$ vs $20.3\pm 3.9\%$ par rapport au contrôle, $P < 0.01$).

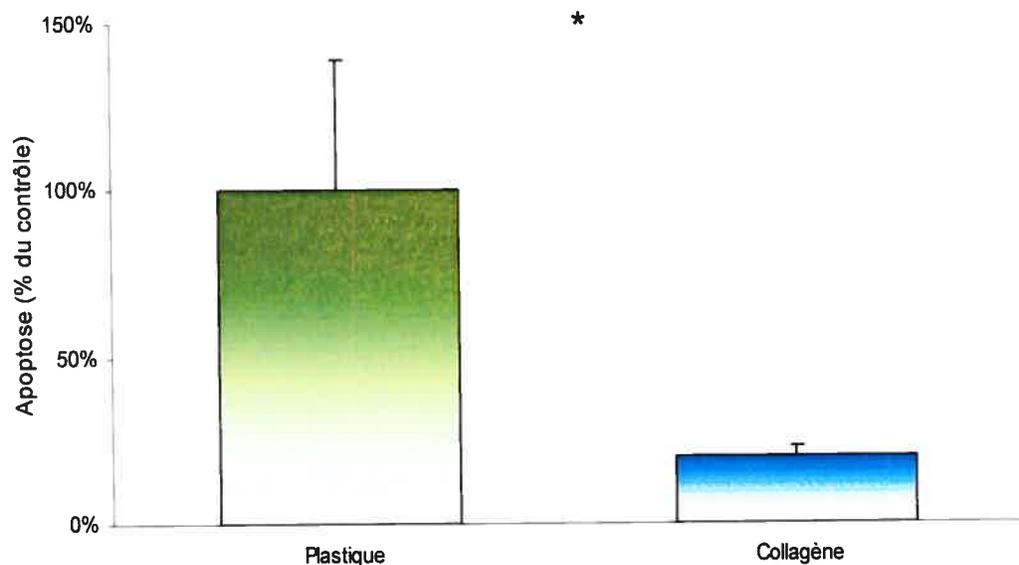


Figure 7 : Effet du collagène sur l'apoptose induite par le TNF- α .

Effet du collagène sur l'apoptose de cultures d'hépatocytes primaires soumis à une préincubation d'une demi-heure à l'actinomycine D [10nM] et traités au TNF- α [25ng/ml] et à l'actinomycine D [10nM] pour une période de 20 heures. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% puis colorées au Hoechst 33258. Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle sur plastique.

* $P < 0.05$, $n=2$

1.4 Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes

L'effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes primaires induite par le récepteur Fas est opposé à celui du collagène. En effet, la figure 8 démontre une augmentation significative de l'index apoptotique lors de la culture sur lit de fibronectine, après 6h de stimulation à l'anti-Fas à 250ng/ml, par rapport à une culture contrôle sur plastique ($26.78 \pm 0.94\%$ vs $15.55 \pm 1.08\%$). Cet effet est également reproductible dans le temps entre 2 et 8 heures (figure 9) et est dépendant de la concentration de fibronectine présente, entre 2.5 et $25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (figure 10).

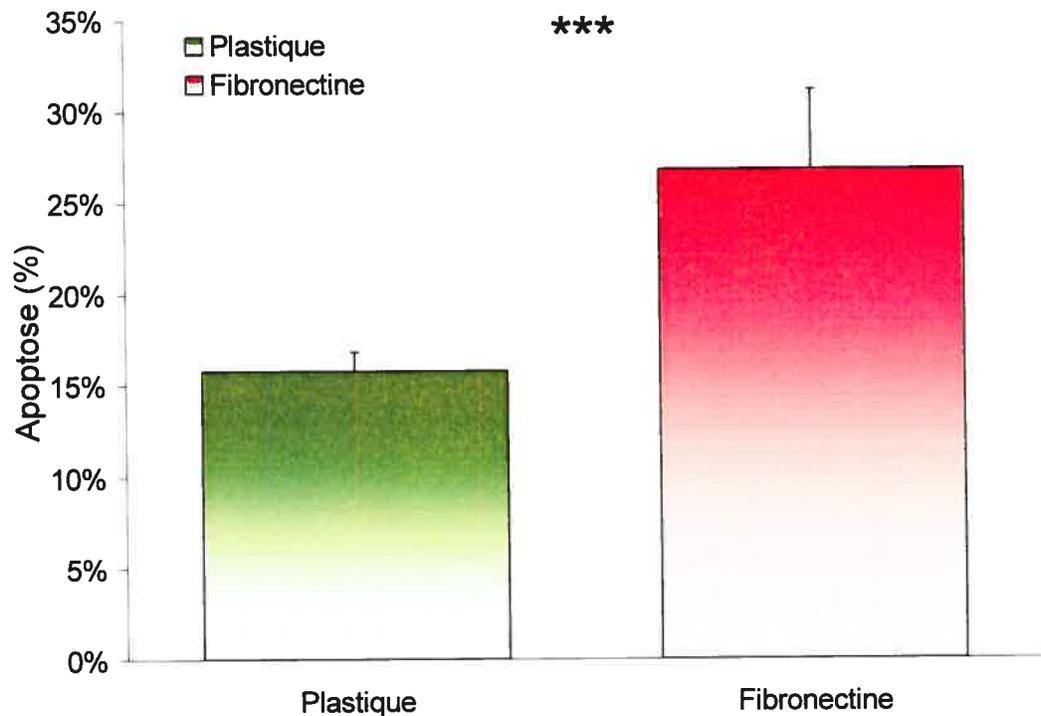


Figure 8 : Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes.

Les hépatocytes ont été soumis à l'anti-Fas [250ng/ml] durant 6h en présence ou non de fibronectine [$5\mu\text{g}/\text{cm}^2$]. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% et colorées au Hoechst 33258.

*** $P < 0.001$, $n=6$

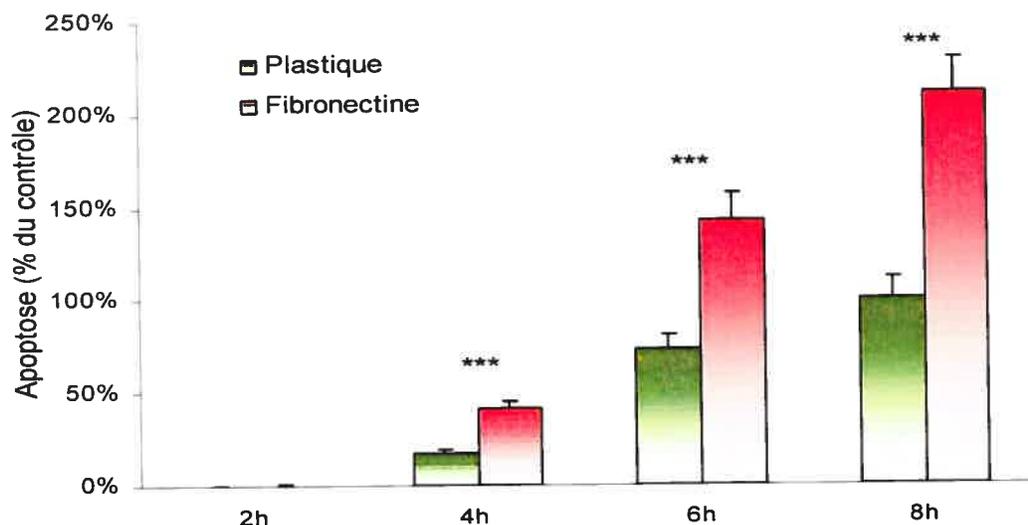


Figure 9 : Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes dans le temps. Cinétique de l'amplification de l'index apoptotique par la fibronectine [$5\mu\text{g}/\text{cm}^2$] en présence d'anti-Fas [$250\text{ ng}/\text{ml}$] entre 2 et 8 heures de culture. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% et colorées au Hoechst 33258. Les résultats sont exprimés par rapport à une culture sur plastique de 8h.

*** $P < 0.001$, $n=3$

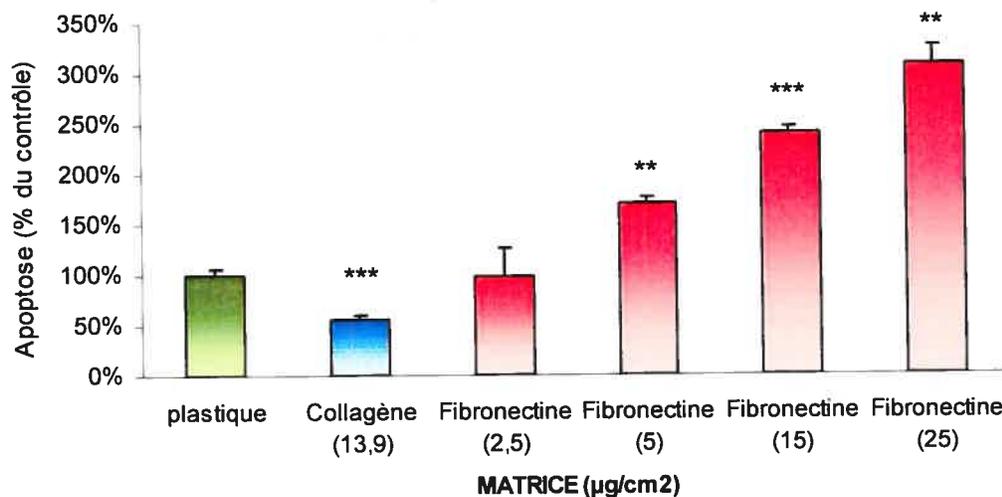


Figure 10 : Effet de la concentration de fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes. Variation de l'index apoptotique selon la concentration de fibronectine [de 2.5 à $25\mu\text{g}/\text{cm}^2$] lors de cultures primaires d'hépatocytes soumis à l'anti-Fas [$250\text{ ng}/\text{ml}$] pendant 6h, par rapport au plastique à une culture sur plastique. Les résultats de culture sur collagène sont également donnés à titre indicatif.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, par rapport au plastique, $n=3$

2 LA VOIE DES MAPK, ERK 1 ET 2

2.1 Activation des ERK1 et 2

L'utilisation d'anticorps spécifique pour les MAPK activées a permis d'analyser le niveau d'activation des MAPK selon la présence ou non de collagène au fond du pétri. L'anticorps utilisé reconnaît autant la version phosphorylée de ERK1 (44 kDa) que de ERK2 (42 kDa). La figure 11 représente la somme de l'intensité des 2 bandes obtenues par immunobuvardage, correspondant aux deux isoformes, lors d'une cinétique d'activation, par rapport à l'actine. Ainsi, la présence de collagène induit une activation de la voie des MAPK. L'activation de ERK2 semble plus importante que celle de ERK1.

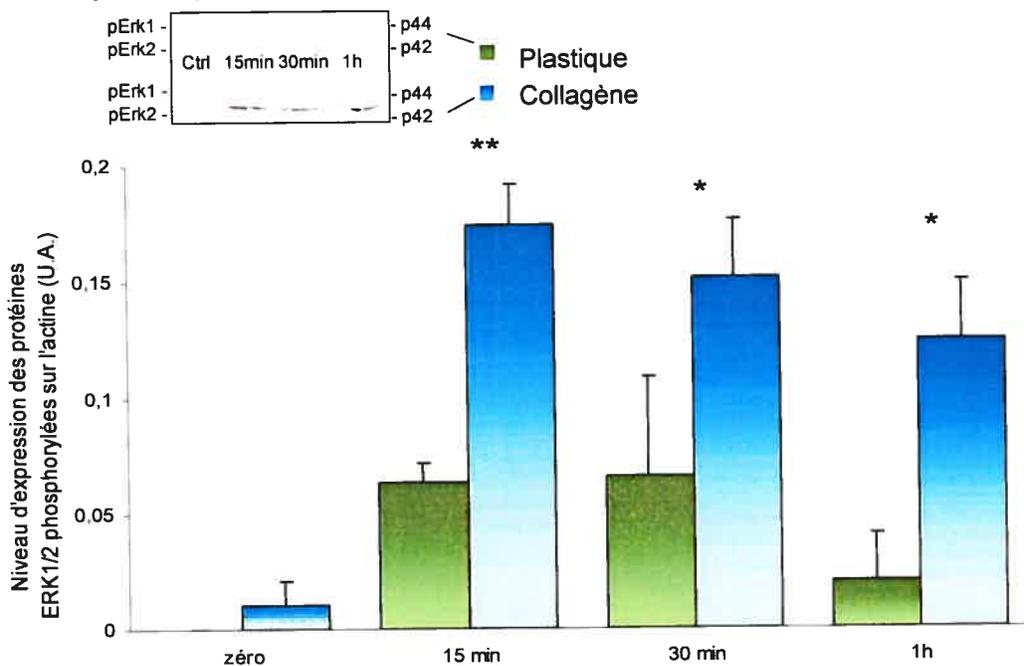


Figure 11 : Activation des MAPK. Cinétique de l'activation de la voie des MAPK par le collagène [13.9µg/cm²], par rapport à la culture sur plastique, dans la première heure suivant l'attachement. L'utilisation d'un anticorps ne reconnaissant que la version phosphorylée des ERK1 et 2 permet d'analyser leur niveau d'activation par immunobuvardage.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$

2.2 Effets des inhibiteurs de la voie des MAPK sur l'apoptose

Des bloqueurs de la voie des MAPK ont été utilisés pour déterminer si l'activation des ERK est réellement associée à la protection du collagène de type I sur l'apoptose des hépatocytes. Ainsi, le bloqueur PD98059, qui est un inhibiteur partiel et compétitif de l'activation des MAPK par les MEK, et le U0126, qui est un bloqueur total et non-compétitif de cette même activation, ont été utilisés⁹⁶. Le LY294002, qui est quant à lui un inhibiteur de l'activation de l'AKT/PKB, soit l'effecteur principal de la voie de la PI-3Kinase a également été utilisé. La figure 12 démontre que l'ajout d'inhibiteur de la voie des MAPK abolissent la différence entre la culture sur plastique et sur collagène (écart de $10.2 \pm 9.42\%$ vs $36.76 \pm 9.04\%$ pour le contrôle, $P < 0.05$ pour le PD98059). De son côté, l'inhibiteur U0126, en plus d'éliminer la différence d'index apoptotique entre le plastique et le collagène, rehausse le niveau de base d'apoptose des hépatocytes (172% pour le plastique et 174% du contrôle pour le collagène). Enfin, le LY294002 réduit lui aussi légèrement l'index apoptotique (non-significatif), ce qui indique une légère implication de la voie de l'AKT/PKB dans la protection du collagène contre l'apoptose.

2.3 Souris transgéniques ERK1 -/-

Afin de s'assurer de l'implication des ERK 1 et 2 dans la protection du collagène contre l'apoptose des hépatocytes, nous avons utilisés des souris transgéniques n'exprimant pas le gène ERK1. Nous aurions également voulu utiliser des souris n'exprimant le gène ERK2, mais celles-ci ne sont pas viables et meurent rapidement *in utero* dû à une déficience dans la différenciation trophoblastique¹⁰¹. L'utilisation de souris n'exprimant pas le gène de l'ERK1 dans des études d'apoptose a permis d'obtenir un index apoptotique similaire pour les cultures sur collagène ou

en présence de collagène. En effet, les hépatocytes provenant des souris contrôles, ont également été protégés par le collagène alors que les souris KO pour ERK1 était résistante à l'effet protecteur du collagène. L'index apoptotique des cultures sur collagène à partir des souris contrôle, correspond à 64% de l'index apoptotique sur plastique. Chez les souris transgéniques, ce rapport s'élève à 101% de la culture sur plastique.

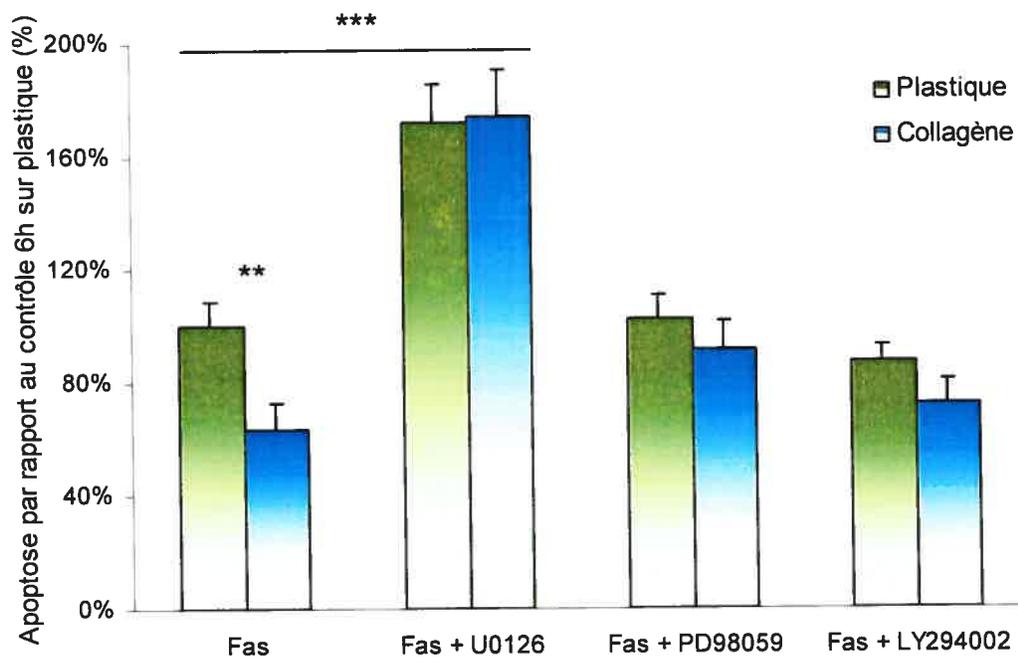


Figure 12 : Effet des inhibiteurs d'activation des voies de survie cellulaire. Effets des inhibiteurs de la voie des MAPK [PD98059 à 20 μ M et U0126 à 25 μ M] et de la voie de la PI3-Kinase [LY294002 à 40 μ M] sur l'apoptose des hépatocytes soumis à l'anti-Fas [250ng/ml] pendant 6h. Les résultats sont comparés à une culture contrôle sur plastique sans inhibiteur des voies de signalisation cellulaire. Les hépatocytes ont ensuite été fixés à la formaline 5% puis colorés au Hoechst 33258.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$

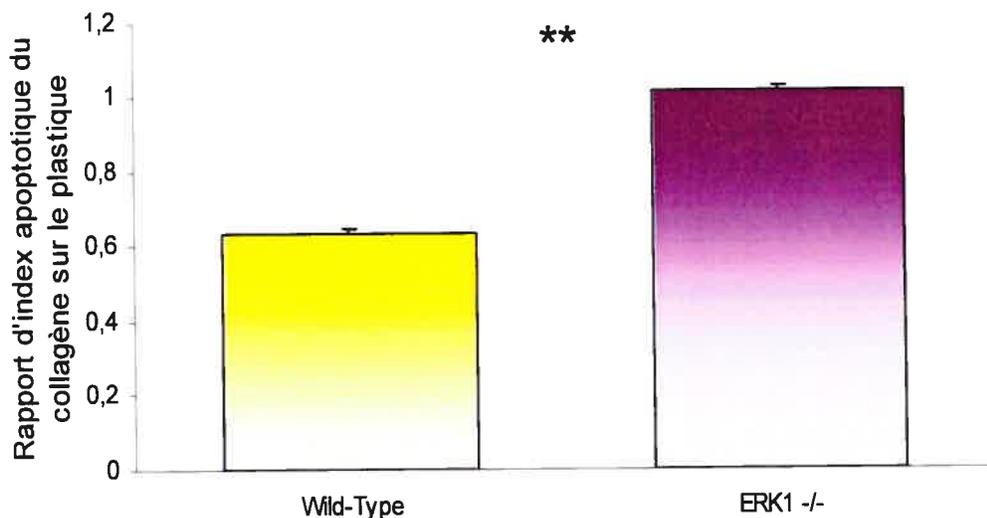


Figure 13 : Protection du collagène contre l'apoptose des hépatocytes chez les souris ERK1 -/-. Ratio des index apoptotiques des cultures sur collagène par rapport au contrôle sur plastique, suite à une stimulation à l'anti-Fas [250ng/ml] durant 6h chez les souris ERK1-/- et chez les souris Wild-type de souche CD1.

** $P < 0.01$, $n = 3$

3.4 Effet de l'EGF sur l'apoptose des hépatocytes

L'EGF est un activateur de la voie des ERK via son récepteur membranaire¹⁰². Il a été utilisé afin d'augmenter considérablement le signal des ERK, afin de surpasser l'activation des MAPK par le collagène. La figure 14 présente l'inhibition de la réaction apoptotique par l'EGF, en présence d'anti-Fas pendant 6h. Sans EGF, on observe la protection du collagène contre l'apoptose (46% moins d'apoptose sur collagène), tandis que cette protection est absente en présence d'EGF (12% de l'apoptose observé par rapport au contrôle, tant sur plastique que sur collagène). Il n'est pas surprenant de voir une protection de l'apoptose des hépatocytes par l'EGF¹⁰³. La perte de protection du collagène permet une fois encore d'associer les MAPK à la protection du collagène de type I contre l'apoptose des hépatocytes.

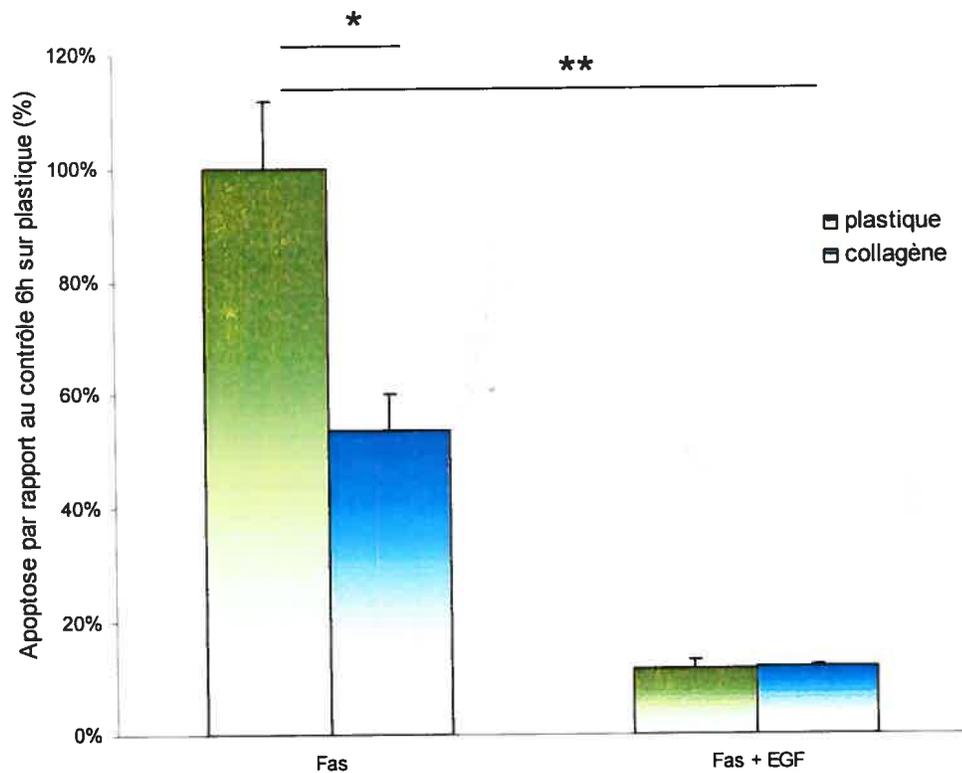


Figure 14 : Effet de l'EGF sur l'apoptose des hépatocytes en présence de collagène. Index apoptotiques de cultures d'hépatocytes primaires soumis à l'anti-Fas [250ng/ml] pendant 6h en présence d'EGF [50ng/ml], avec ou sans collagène au fond des pétris. Les cellules ont ensuite été fixées à la formaline 5% et colorées au Hoechst 33258. Les résultats sont exprimés par rapport à la culture sur plastique sans EGF.

$P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$

3 EFFET DU COLLAGÈNE SUR L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE LA FAMILLE BCL-2 ET SUR L'ACTIVATION DES CASPASES

3.1 Réduction de l'expression de protéines pro-apoptotiques *in vitro*

La présence de collagène réduit significativement l'expression de la principale protéine pro-apoptotique du foie, la protéine BID. En effet, lorsque des cultures d'hépatocytes primaires de souris ont été effectuées sur plastique ou sur collagène, une réduction de 73% dans l'expression de cette protéine (0.43 ± 0.11 vs 1.62 ± 0.09 , lorsque normalisée sur l'actine, $P < 0.01$) a été observé après 4h (figure 15) Une autre protéine pro-apoptotique de la famille de BCL-2, la protéine BAX, est elle aussi exprimée de façon réduite. Le collagène réduit de 61% l'expression de BAX (0.31 ± 0.03 vs 0.79 ± 0.05 , lorsque normalisée sur l'actine, $P < 0.01$) (figure15).

3.2 Expression de la protéine anti-apoptotique BCL-X_L

BCL-X_L est la principale protéine anti-apoptotique des hépatocytes¹⁰⁴. Son expression peut moduler la poursuite de la réaction apoptotique au niveau de la mitochondrie¹⁰⁵. Lorsque cette protéine a été analysé sur les lysats cellulaires provenant des mêmes échantillons que ceux analysés pour Bid et Bax, l'expression de cette protéine n'a pas été influencée par la présence de collagène après 4h heure de culture (figure 16).

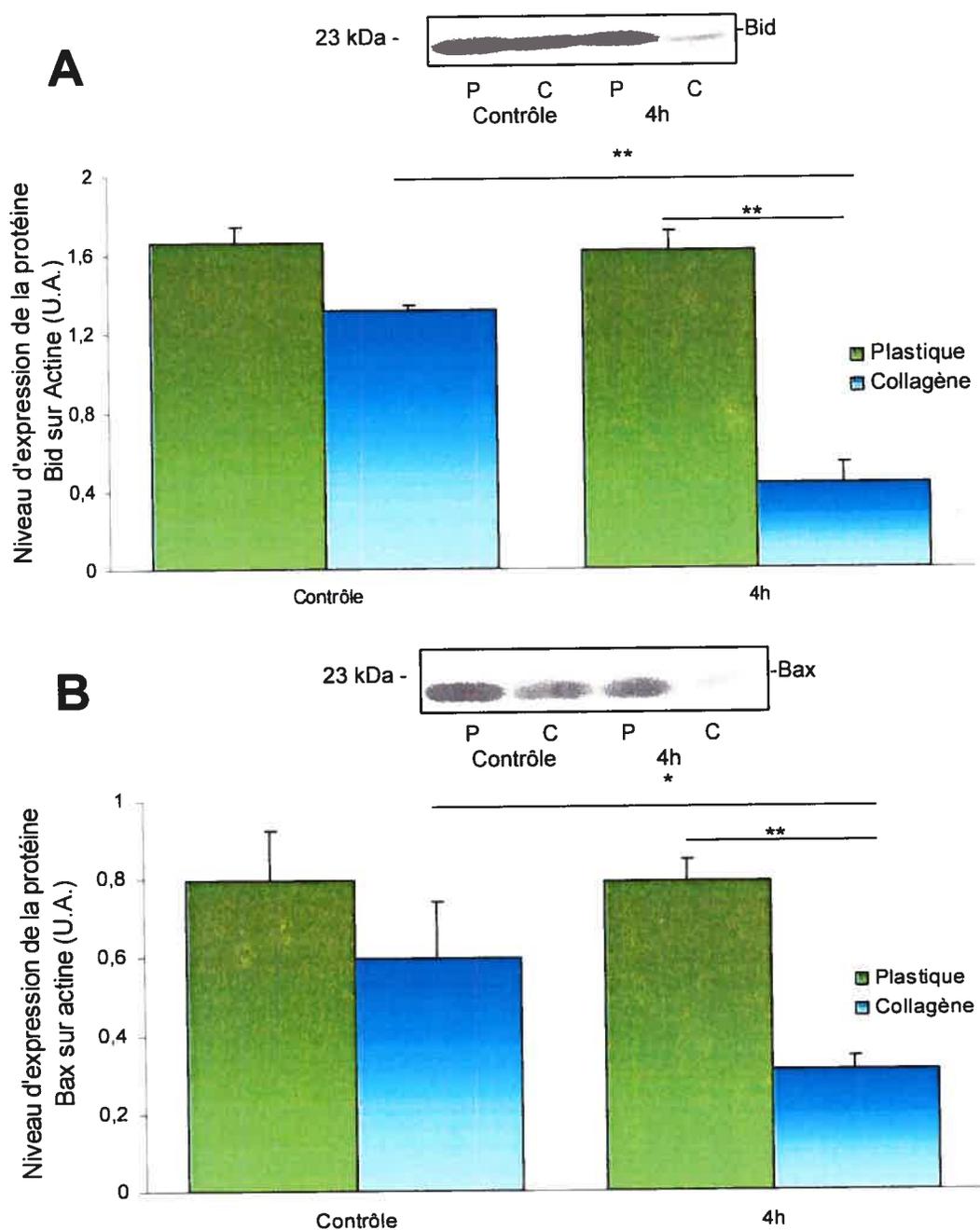


Figure 15: Expression différentielle des protéines pro-apoptiques en présence de collagène A) : réduction de l'expression de BID, ramené sur l'expression de l'actine, par le collagène après 4 heures de culture. B) Réduction de l'expression de la protéine proapoptotique BAX par le collagène après 4h, ramenée sur l'actine.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 10$

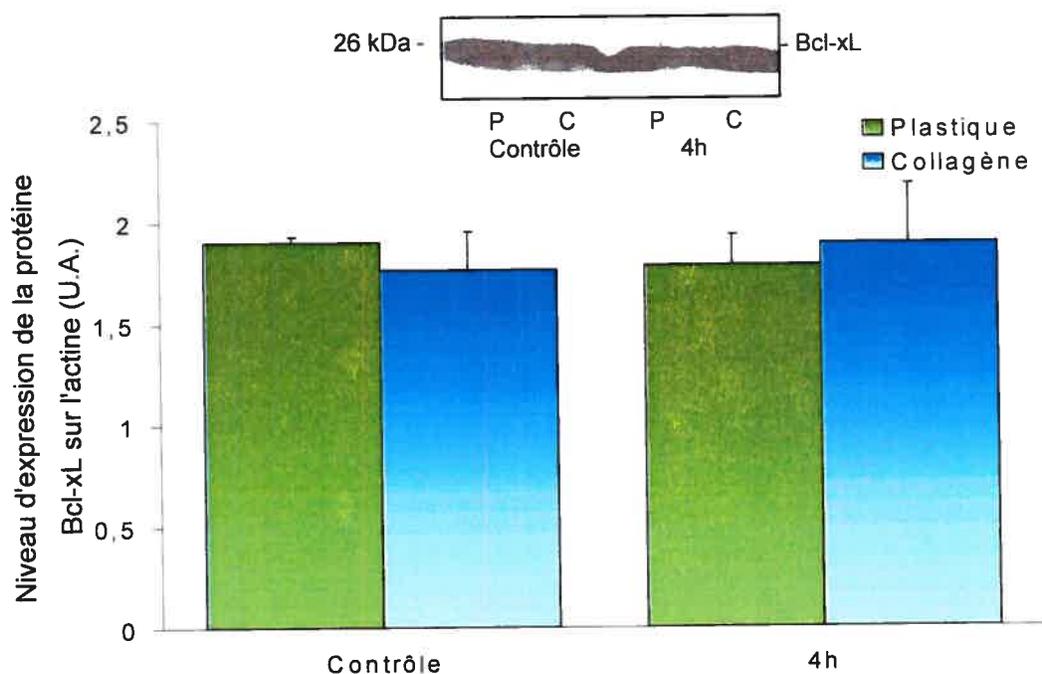


Figure 16 : Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L en présence de collagène. Niveau d'expression de la protéine Bcl-x_L en condition de base en présence ou non de collagène après 4 heures de culture cellulaire. La quantification de l'expression a été normalisée sur l'expression de l'actine. n=10

3.3 Effet de l'inhibiteur U0126 sur l'expression de la protéine BID

Afin d'évaluer si la réduction de l'expression de la protéine pro-apoptotique BID était due à l'activation des ERK, des cultures d'hépatocytes de souris Balb/c sur collagène en présence ou non de l'inhibiteur de l'activation de cette voie métabolique (U0126) ont été comparées à des cultures sur plastique. Le U0126 ramène l'expression de la protéine BID à un niveau s'approchant de celui de la culture sur plastique ($39.7 \pm 3.4\%$ vs $75.3 \pm 5.8\%$, par rapport au contrôle, $P < 0.01$) après 4 heures de culture.

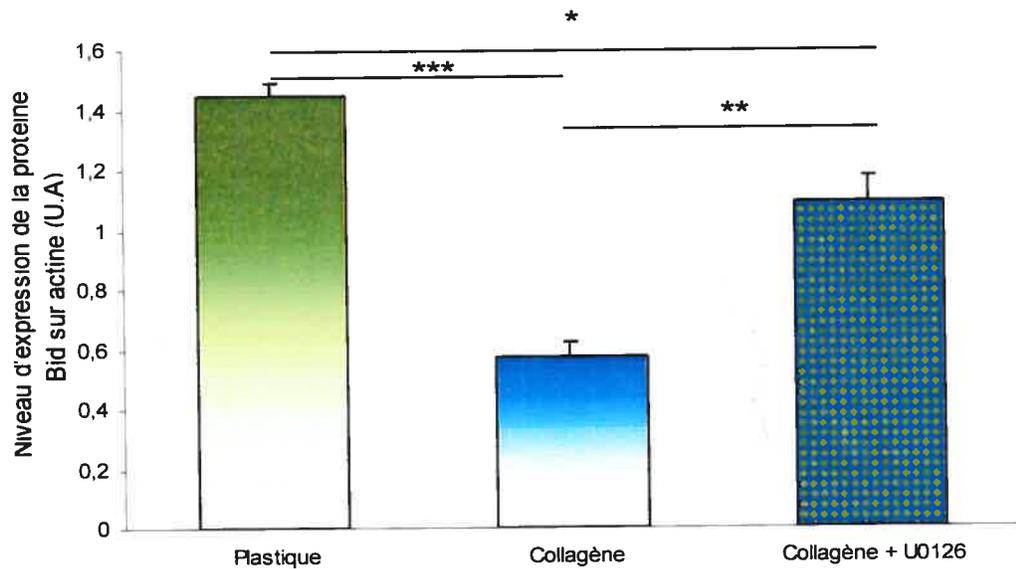


Figure 17 : Effet de l'inhibition de l'activation des MAPK sur l'expression de la protéine Bid. Niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bid en présence de U0126 [25 μ M], un inhibiteur de l'activation de la voie des MAPK, après 4h de culture cellulaire en présence ou non de collagène. L'expression de la protéine Bid a été normalisée sur l'expression de l'actine.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=3$

3.4 Effet du collagène sur l'activation des caspases *in vitro*

Les caspases étant subdivisées en deux sous-groupes, soient les caspases activatrices et effectrices, une mesure de l'activité d'une enzyme-type de chaque groupe a été effectuée. Le Fas fait appel à la caspase-8 activatrice et à la caspase-3 effectrice. La mesure de l'activité de la caspase-8 a montré un effet protecteur du collagène de type I. La figure 18 illustre cette diminution assez tôt dans la réaction par une action sur la caspase-8 activatrice (0.017 ± 0.011 vs 0.055 ± 0.010 , $P < 0.01$, après 2 heures de stimulation au Fas). Quatre heures après la stimulation à l'anti-Fas, alors que la réaction apoptotique est enclenchée, le collagène réduit aussi l'activité de la caspase-3 effectrice (0.66 ± 0.08 vs 0.92 ± 0.02 , $P < 0.05$)

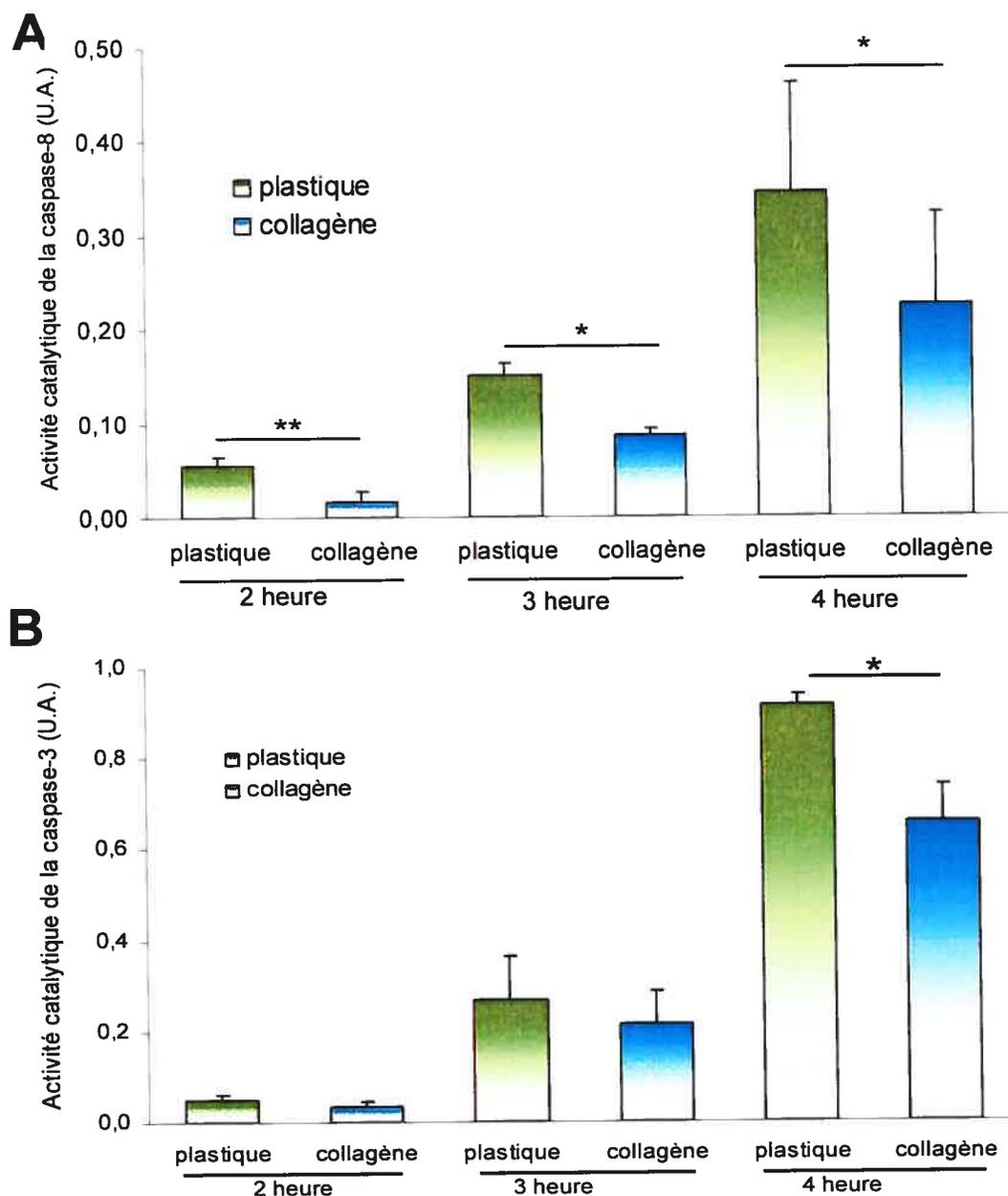


Figure 18: Effet du collagène sur l'activation des caspases activatrices et effectrices. A) Cinétique de l'effet du collagène sur l'activation de la caspase-8 lors de stimulation à l'anti-Fas [250ng/ml] après 2, 3 et 4 heures d'exposition. B) Cinétique de l'effet du collagène sur l'activation de la caspase-3 lors de stimulation à l'anti-Fas [250ng/ml] après 2, 3, 4 heures d'exposition.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $n=3$

4 EFFETS DES INJECTIONS DE THIOACÉTAMIDE ET DE LA PÉRIODE DE RÉCUPÉRATION

4.1 Mesure de l'état de l'étendue de la fibrose

La coloration au rouge Sirius permet de mesurer de façon semi-quantitative les fibres de collagènes présentes dans le foie sur une coupe histologique. Le score d'Ishak¹⁵ nous permet d'évaluer l'atteinte hépatique des souris par la thioacétamide. Toutes les souris ayant été injectées à la saline obtiennent un score de 0, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fibrose dans leur foie. Cependant, les souris ayant subi le traitement à la thioacétamide pendant 3 mois obtiennent en moyenne un pointage de 3.6 ± 0.4 , ce qui correspond à un état avancé de fibrose, caractérisé par des ponts fibreux entre des secteurs portaux ou centraux du foie. La période de récupération de deux semaines a permis d'abaisser de façon significative ce score à 1.8 ± 0.2 , ce qui correspond à la présence de quelques prolongement fibreux dans certaines régions portales du foie.

Tableau 3 : Score de Ishak¹⁶

Analyse morphologique de la fibrose suite à une coloration au Rouge Sirius des foies soumis au traitement fibrogénique ou à l'injection de salin, avec ou sans période de récupération. Attribution d'un pointage selon le score d'Ishak tel que 0 indique l'absence totale de fibrose et 6 indique une cirrhose complète et définitive.

n=10

Mesure de fibrose		
Condition	score d'Ishak	P
Salin	0 ± 0	ns
Salin + récupération	0 ± 0	ns
Thioacétamide	$3,6 \pm 0,4$	$P < 0,01$
TAA + récupération	$1,8 \pm 0,2$	

4.2 Dosage d'hydroxyproline

Ce dosage nous permet de quantifier directement la fibrose du foie. Le traitement fibrogénique a fait plus que doubler la quantité d'hydroxyproline dans le foie par rapport aux souris contrôles injectées au salin ($726 \pm 112 \mu\text{g/g}$ vs $328 \pm 49 \mu\text{g/g}$ de foie). Ce dosage a aussi démontré que les deux semaines de récupération ont permis de ramener les niveaux d'hydroxyproline à un seuil approchant le niveau des contrôles ($401 \pm 40 \mu\text{g/g}$ vs $328 \pm 49 \mu\text{g/g}$ de foie, NS). On peut également observer qu'un traitement d'un mois à la thioacétamide a peu d'effet sur le contenu du foie en hydroxyproline avec un taux de $323 \pm 30 \mu\text{g} / \text{g}$ de foie. Ce résultat est en fait très similaires aux deux groupes ayant été injectés au salin (328 et $330 \mu\text{g/g}$ de foie). Ces trois groupes partagent donc la même composition matriciel, malgré les injections de thioacétamide.

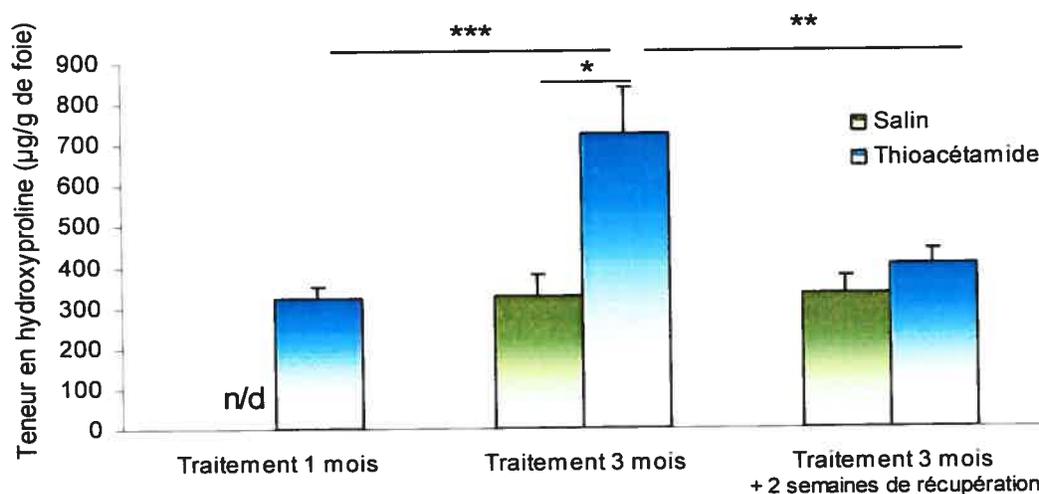


Figure 19 : Effet du traitement à la thioacétamide sur la teneur du foie en collagène. Dosages biochimiques de la concentration d'hydroxyproline présente dans les foies des souris soumises au traitement à la thioacétamide ou au salin. Certaines souris ont subi un mois d'injection de thioacétamide ($200 \mu\text{g/g}$, trois fois par semaine). D'autres souris ont subi le même traitement fibrogénique ou ont reçu seulement le vecteur salin pendant trois mois. Certaines souris ayant subi trois mois d'injection et ont été sacrifiées deux semaines après la fin des traitements.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 10$

4.3 Activation de la voie des MAPK

L'analyse de l'activation des ERK *in vivo* permet de voir l'implication de la matrice extracellulaire dans la signalisation intracellulaire. Les ERK des foies fibrotiques sont plus activées que dans les foies contrôles (0.19 ± 0.04 vs 0.02 ± 0.02 , $P < 0.001$). La période de récupération élimine cet écart et ramène l'activation des ERK à un niveau avoisinant celui des foies contrôles. On peut également remarquer que ERK1 semble beaucoup plus activés que ERK2.

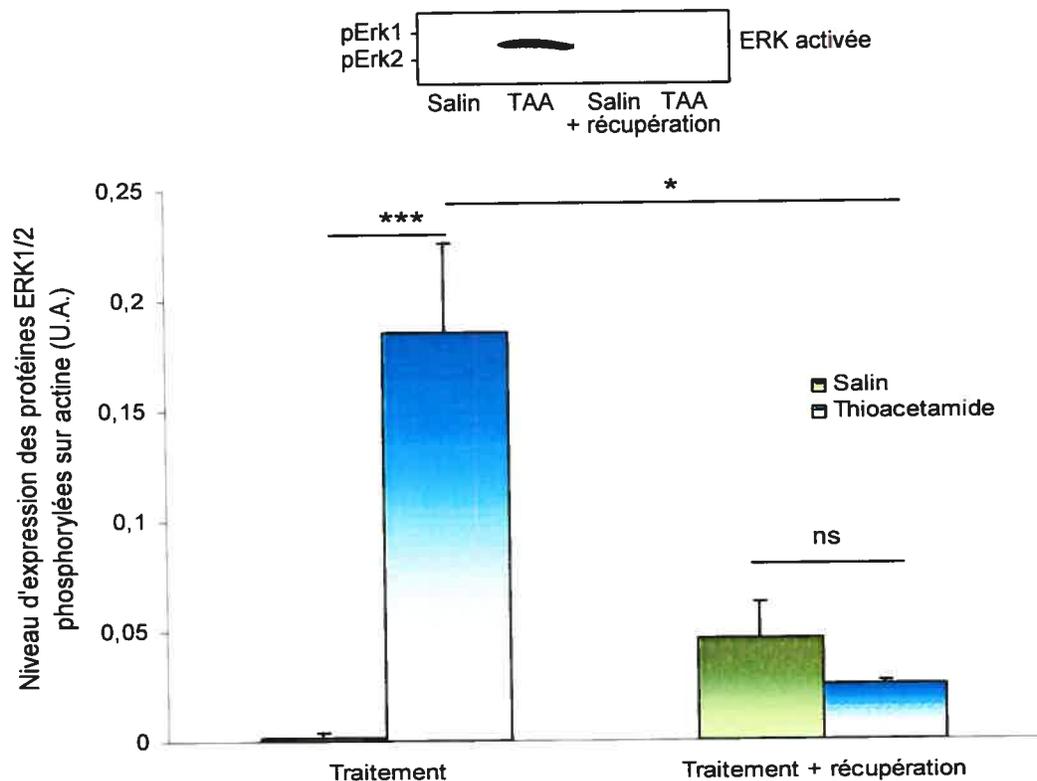


Figure 20 : Niveau d'expression des ERK1 et 2 phosphorylées dans les foies traités à la thioacetamide. Niveau d'activation des ERK1 et 2 dans les foies soumis au traitement à la thioacétamide ou au salin pendant trois mois, avec ou sans période de récupération. Les niveaux d'expressions obtenus ont été normalisés sur l'expression de l'actine.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n = 3$

5 TAUX DE SURVIE À L'INJECTION D'ANTI-FAS

Les souris fibrotiques ont toutes survécu à l'injection d'anti-Fas alors que 60% des souris contrôles sont mortes dans les 6h suivant l'injection. Des taux de décès équivalents ont été obtenus chez les souris ayant été injectées deux semaines après la fin du traitement fibrogénique (Salin 50% et TAA 55% de décès). Un taux de survie de 45% a également été obtenu chez des souris ayant subi un traitement à la thioacétamide pendant 1 mois, 6 heures après l'injection d'anti-Fas.

Tableau 4 : Taux de survie des souris injectées avec l'anti-Fas. Taux de survie des souris soumises à un traitement fibrogénique ou à la saline, 6 heures après l'injection intrapéritonéale d'anti-Fas [0.5µg/g de poids corporel]. Certaines souris ont reçu le traitement fibrogénique pendant 1 mois, alors que les autres ont reçu 3 mois de traitement, thioacétamide ou salin. Certaines souris ayant été injectées pendant trois mois ont été sacrifiées après une période de récupération de deux semaines après la fin des traitements.

Taux de survie 6 heures après l'injection d'anti-FAS			
	Survie	Mort	%
1 mois TAA	5	6	45%
3 mois Salin	4	6	40%
3 mois TAA	10	0	100%
Salin + 2 semaines récup.	5	5	50%
TAA + 2 semaines récup.	5	6	45%

6 EFFET DE LA FIBROSE SUR L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE LA FAMILLE BCL-2

6.1 Expression des protéines de la famille Bcl-2

Tel que mentionné préalablement, les niveaux d'expression des protéines de la famille Bcl-2 vont moduler la propagation du signal apoptotique. La figure 21 illustre les résultats d'immunobuvardage effectuée à partir d'homogénats de foie de souris ayant subi trois mois de traitement au salin ou à la thioacétamide. La protéine anti-apoptotique Bcl-x_L est plus exprimée dans les foies fibrotiques que dans les foies normaux (0.219 ± 0.36 vs 0.018 ± 0.002 $P < 0.001$). La protéine Bax est elle aussi plus exprimée dans les foies fibrotiques (0.311 ± 0.066 vs 0.096 ± 0.013 $P < 0.01$). De son côté, la principale protéine proapoptotique, Bid, est exprimée de manière uniforme dans les deux cas. Le facteur important dans la poursuite de la réaction apoptotique est le ratio entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. La figure 21B illustre ce ratio. Étant donné que la protéine Bid ne varie que très peu, la valeur a été obtenue par le ratio de l'expression des protéines Bcl-x_L sur Bax dans les 10 échantillons de foies fibrotiques et contrôles. L'augmentation du ratio (0.702 ± 0.18 vs 0.189 ± 0.02 , $P < 0.01$) chez les souris fibrotiques indique que la variation de l'expression de Bcl-x_L joue un rôle plus important que la variation de l'expression de Bax dans la modulation de la poursuite du signal apoptotique.

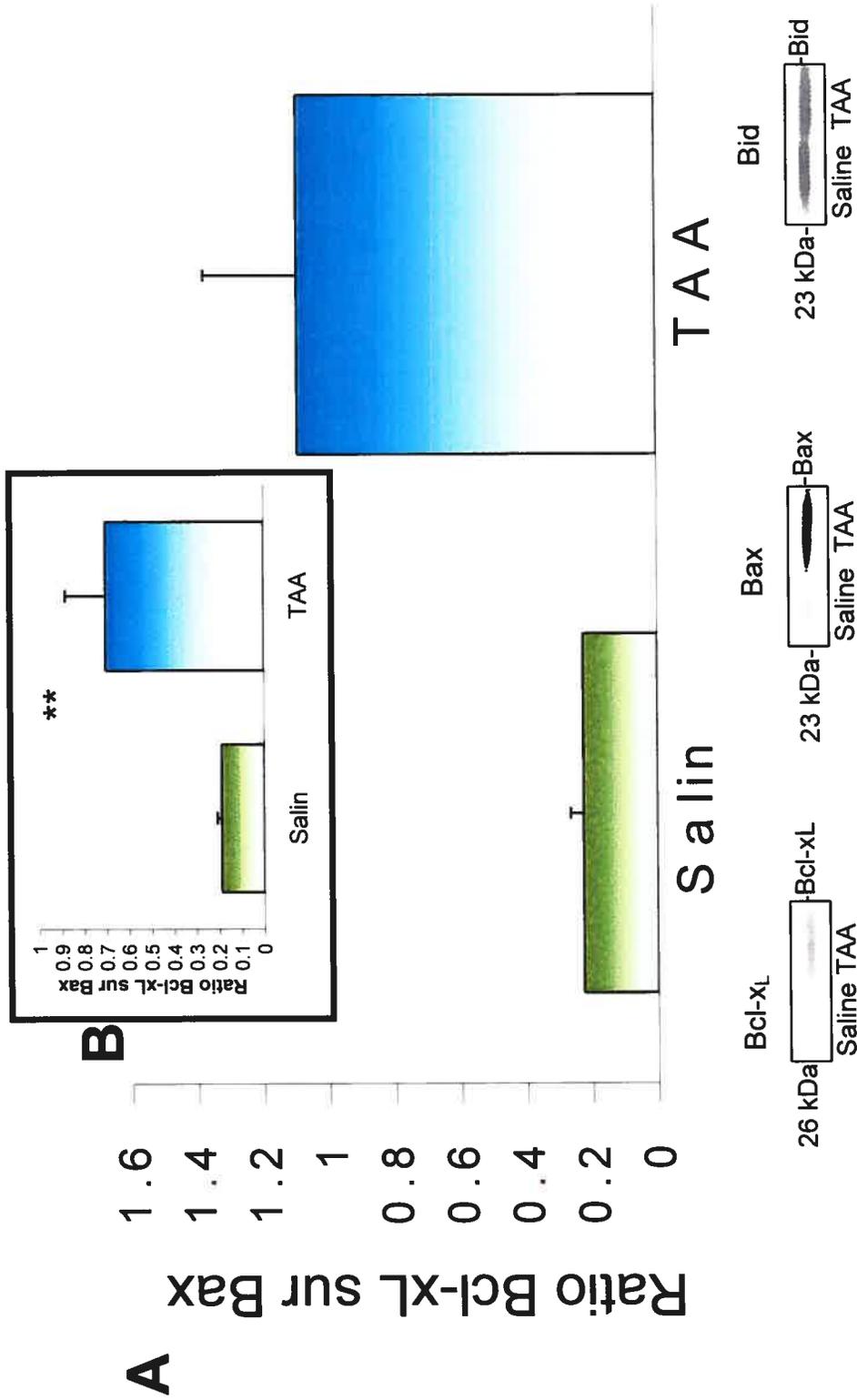


Figure 21 : Effet du traitement fibrogénique sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2.
 A) Effets des injections de thioacétamide sur l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en comparaison à l'injection de salin. B) Ratio de l'expression de la protéine Bcl-x_L sur l'expression de la protéine Bax.
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 10$

6.2 Niveau de clivage de la protéine Bid

Lorsque la réaction apoptotique est enclenchée, la protéine cytoplasmique Bid est tronquée par la caspase 8 et est ensuite redirigée vers la mitochondrie. Malgré un niveau de base de Bid semblable, la protéine clivée (tBid) est 67% moins abondante 3h après l'injection d'anti-Fas (0.018 ± 0.003 vs 0.006 ± 0.001 , normalisée sur l'actine, $P < 0.01$) et 32% moins abondante après 6h (0.205 ± 0.019 vs 0.140 ± 0.010 , normalisée sur l'actine, $P < 0.01$) en situation de fibrose par rapport aux souris injectées au salin. Ces écarts ont toutefois disparu lorsque les souris ont récupéré pendant 2 semaines suite au traitement fibrogénique de trois mois.

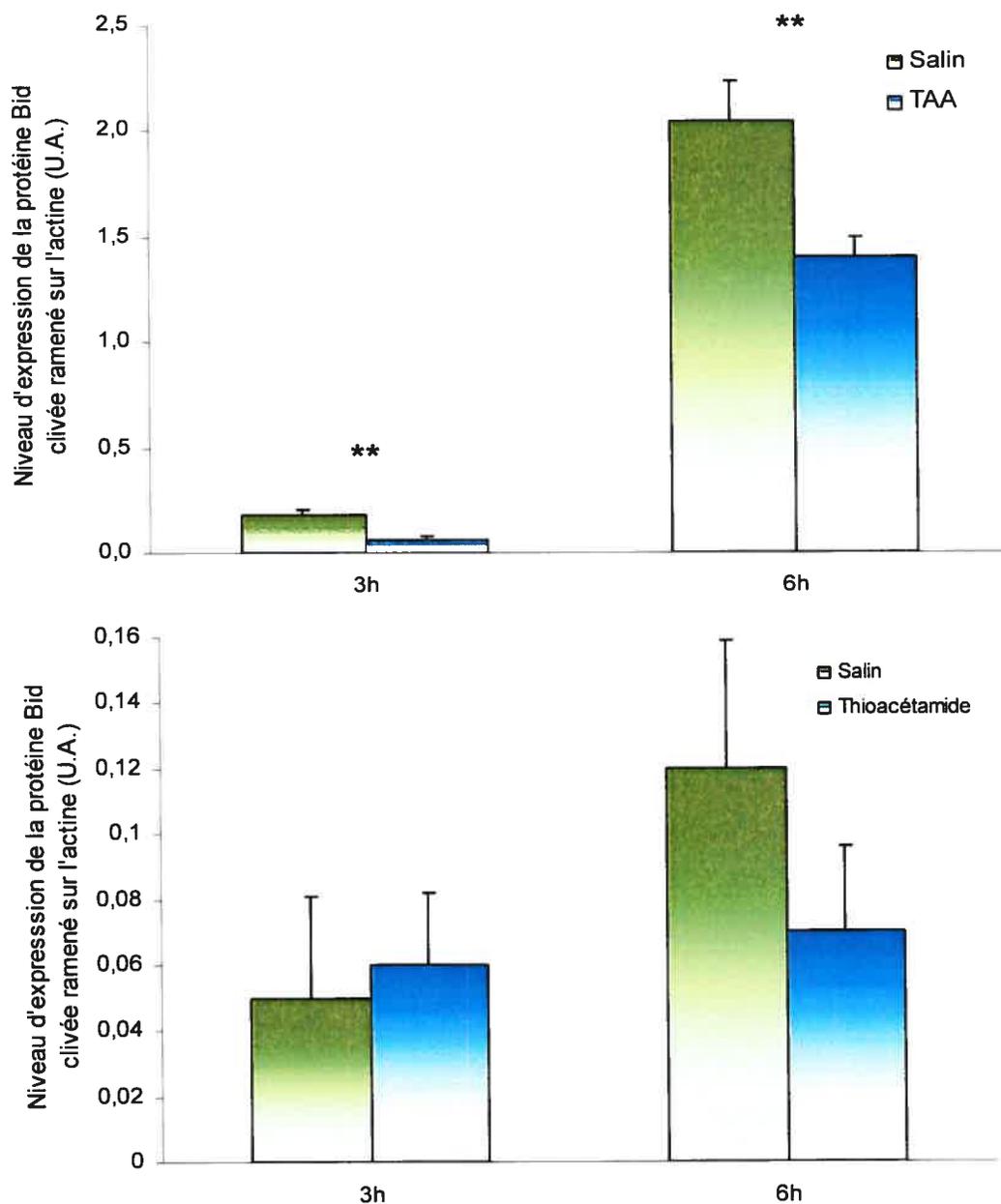


Figure 22 : Effet de la fibrose sur le clivage de la protéine Bid
 A) Clivage de la protéine Bid suite à l'injection d'anti-Fas [0.5µg/g de poids corporel] après 3 mois de traitement fibrogénique. B) Clivage de la protéine Bid suite à l'injection d'anti-Fas [0.5µg/g de poids corporel] deux semaines après le traitement fibrogénique de 3 mois.

* $P < 0.05$, n=10

7 EFFET DE LA FIBROSE SUR L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3

L'activation de la caspase-3 est elle aussi modifiée par la présence de fibrose. Trois heures après l'injection d'anti-Fas, l'activité de la caspase-3 est deux fois plus importante chez les souris contrôle que chez les souris fibrotiques (8.64 ± 2.15 vs 4.05 ± 0.68 , $P < 0.05$). Le niveau basal d'activation de la caspase-3 sans stimulation par l'anti-Fas est également six fois plus élevé (11.17 ± 2.19 vs 1.79 ± 0.14 , $P < 0.001$). Toutefois, 6 heures après l'injection d'anti-Fas, aucune différence significative n'est perceptible.

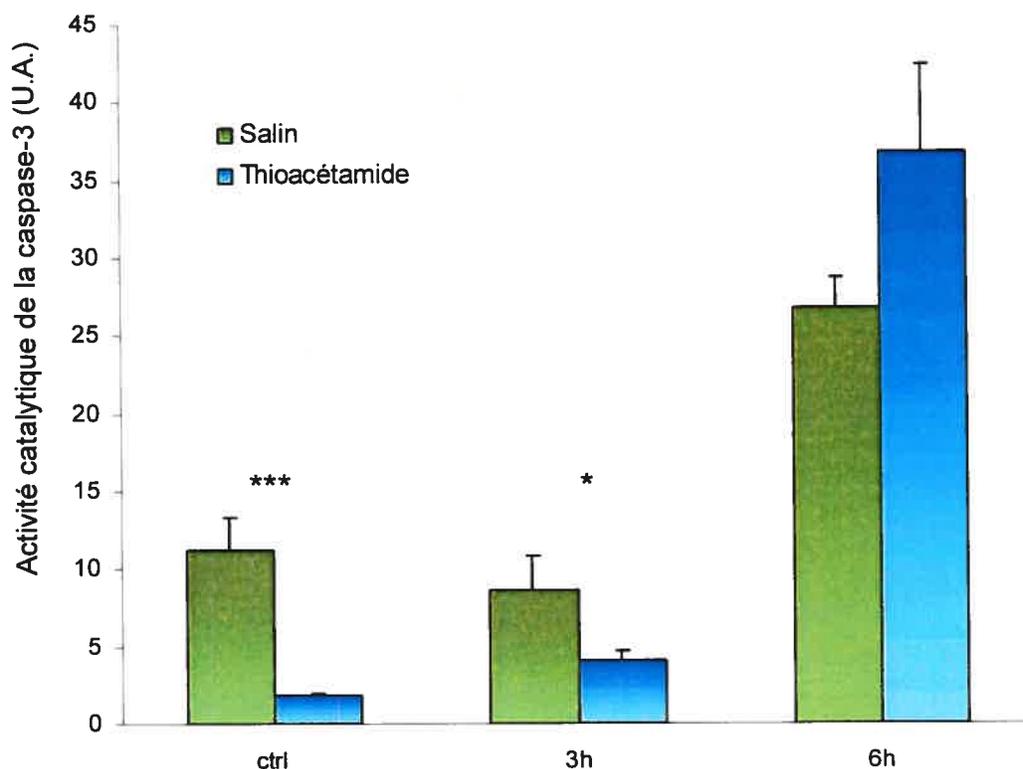


Figure 23 : Effet des traitements de thioacétamide sur l'activité de la caspase-3. Effet de la fibrose sur l'activité de la caspase-3 induite par l'injection d'anti-Fas [0.5µg/g de poids corporel] après 3 mois d'injection de thioacétamide ou de salin.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n=10$

Discussion

1 SIGNALISATION ET RÔLE DU COLLAGÈNE DANS L'APOPTOSE DES HÉPATOCTES

1.1 Présence du collagène dans le foie

Malgré qu'il ne soit présent qu'en très faible concentration en situation physiologique, le collagène est un élément important dans l'architecture normale du foie. À l'état normal, les hépatocytes ne reposent pas sur une lame basale, et sont en relation avec très peu de matrice extracellulaire. Ils ne sont donc pas en contact avec le collagène de type I. En situation de toxicité chronique, la quantité de collagène dans le foie est appelée à augmenter considérablement. Les fibres de collagènes se forment à partir des zones portales du foie et viendront s'étirer entre les rangées d'hépatocytes. Le collagène viendra donc entrer en contact avec les hépatocytes.

1.2 Signalisation du collagène

Plusieurs types d'intégrines peuvent se lier à la molécule de collagène. Cependant, un nombre limité d'intégrines sont présentes à la surface des hépatocytes. Sur ceux-ci, l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ est responsable de l'attachement de la cellule à la matrice de collagène, et aussi à la transmission intracellulaire du signal qui en découle. L'intégrine étant souvent étroitement liée aux récepteurs de facteurs de croissances à la surfaces des cellules, sa signalisation emprunte des voies semblables à ces récepteurs plus conventionnels. La transmission du signal de l'intégrine passe donc par l'activation du proto-oncogène Ras, qui active à son tour la protéine Raf1 qui phosphoryle le complexe MEK1/2 qui viendra activer les protéines principales de la voie des MAPK, soient les protéines ERK1

et ERK2. Ces protéines transloquent vers les noyaux et activent une panoplie de facteurs de transcription pour une multitude d'effets cellulaires. Le signal des ERK est considéré comme un signal de « santé » pour la cellule puisque ces effets stimulent la plupart des fonctions cellulaires.

Les kinases ERK1/2 sont donc le dernier chaînon de la signalisation de l'intégrine avant que le signal ne devienne diffus et ne comporte un nombre important de protéines. L'activation des ERK1/2 est facilement détectable et analysable par l'utilisation d'anticorps spécifiques pour la forme phosphorylée, donc active, de ces protéines. L'activation de ces protéines est très rapide; elle peut être perçue dans les minutes suivant une activation du récepteur et ce, malgré le fait que plusieurs intermédiaires soient nécessaires avant l'activation des ERK1/2.

La culture cellulaire en présence de collagène a démontré une activation supérieure pour les ERK2 par rapport aux ERK1. Étonnement, les souris fibrotiques exprimaient quant à elles davantage d'ERK1 activées. Ceci est quelque peu surprenant compte tenu que les deux sous-types d'ERK sont activés par les mêmes kinases, les MEK1 et 2, via la même chaîne de réaction. Il demeure qu'il serait intéressant d'étudier les différences dans l'activation des ERK par le collagène, ainsi que de voir si ceci résulte en une variation dans les diverses implications des MAPK dans la cellule. À prime abord, il ne semble pas y avoir de différences sur le point de vue de la protection contre l'apoptose, mais ceci pourrait tout de même permettre d'en savoir plus sur la signalisation en amont des MAPK. L'analyse du niveau basal d'expression des MAPK (non-phosphorylées) permettraient peut-être d'expliquer cette différence entre l'activation différentielle des ERK1/2 par le collagène *in vivo* et *in vitro*.

1.3 Effet du collagène de type 1 sur l'apoptose des hépatocytes

L'influence du collagène de type I sur la réaction apoptotique n'est pas une chose nouvelle. Une protection du collagène a été démontrée dans le passé dans d'autres modèles, notamment avec des modèles de cancer du pancréas^{111,112}. Peu d'études¹¹³ sont parvenues à démontrer un tel effet sur des cellules primaires, mais aucune publication n'a encore porté sur les hépatocytes ou tout autre lignée hépatique.

En effet, *in vitro*, l'ajout d'anti-Fas ou de TNF- α et d'actinomycine D au milieu de culture permet d'enclencher la réaction d'apoptose de plusieurs types cellulaires. La présence de collagène au fond du p \acute{e} tri lors de culture d'hépatocytes murins permet de protéger partiellement les hépatocytes contre une ou l'autre de ces stimulations apoptotiques. La protection étant effective sur deux des principaux déclencheurs d'apoptose des hépatocytes, il est permis de croire que cet effet s'applique à grande échelle et n'est pas caractéristique d'un type particulier de récepteur de mort cellulaire. Ces réductions, de près de 50% dans le premier cas et de près de 80% dans le second, démontrent que cette protection est importante et que même si elle ne bloque pas totalement l'apoptose des hépatocytes, elle influence suffisamment la réaction pour aider un nombre important de cellules à survivre à une telle stimulation. Le modèle impliquant le récepteur Fas étant plus physiologique puisqu'il ne nécessite pas l'ajout d'un bloqueur de la réplication, nous avons poursuivi les expérimentations avec ce modèle.

Outre l'activation de récepteur de mort cellulaire, plusieurs autres stimuli peuvent déclencher la réaction apoptotique. Or le collagène semble pouvoir jouer un rôle de protection également sur d'autres activateurs d'apoptose, dont les radicaux oxydatif hydroxyle (OH \bullet)¹¹⁴.

1.4 Influence du collagène sur la réaction apoptotique.

Deux grandes familles de protéines interviennent dans la réaction apoptotique. Les protéines de la famille Bcl-2, autant anti- que pro-apoptotiques, servent principalement à la réduction ou à l'amplification de la réaction au niveau de la mitochondrie. Les caspases sont quant à elles responsables de la réaction en soi. Elles sont la cause du clivage de plusieurs éléments importants de la cellule, dont les lamines nucléaires et entraînent ainsi la « mort » de la cellule, mais de façon structurée afin d'éviter les fuites membranaires et l'inflammation qui en découlerait. Le collagène intervient à ces deux niveaux pour moduler la réaction apoptotique. Les caspases, tant activatrices qu'effectrices, étant moins actives, la réaction peut être bloquée avant d'être complétée ce qui permet la survie de la cellule.

La diminution de l'activité des caspases effectrices, comme la caspase-3, est peut-être attribuable au changement dans l'expression des protéines de la famille Bcl-2. En réduisant le ratio de protéines pro- et anti-apoptotiques, l'amplification du signal par la mitochondrie se trouve partiellement inhibée, ce qui réduit la quantité de caspases effectrices activées, donc une réduction dans le déclenchement de l'apoptose. Plus précisément, l'importante réduction de l'expression des protéines pro-apoptotiques Bid et Bax, sans changement dans l'expression de la principale protéine anti-apoptotique Bcl-x_L diminue considérablement l'amplification de la réaction apoptotique et empêche ainsi la réalisation de l'apoptose.

2 SIGNALISATION ET RÔLE DE LA FIBRONECTINE DANS L'APOPTOSE DES HÉPATOCTES

2.1 Signalisation de la fibronectine

La fibronectine utilise une intégrine différente que le collagène pour transmettre son signal à la cellule. Les hépatocytes lient la fibronectine par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. La signalisation de cette intégrine est toutefois très différente de l'intégrine $\alpha_1\beta_1$. En fait, aucune activation, ni de la voie des MAPK, ni de la voie de l'AKT, n'a été observée lors de la culture sur lit de fibronectine (résultats non démontrés). Il nous a été impossible pour le moment d'identifier une voie de signalisation reliée à cette intégrine. La sous-unité β étant la même, il aurait été possible que la fibronectine partage une voie de signalisation avec le collagène, mais cela ne s'est pas avéré être le cas. Il est toutefois possible que la FAK soit impliquée dans la signalisation de la fibronectine, mais d'autres études devront être entreprise avant de pouvoir conclure sur la signalisation de l'amplification de la sensibilité à l'apoptose par la fibronectine.

2.2 Effet de la fibronectine sur l'apoptose des hépatocytes

La présence de fibronectine augmente considérablement l'apoptose des hépatocytes. Cet effet est toutefois difficile à expliquer étant donné que la signalisation de cette protéine de la matrice demeure inconnue. La fibronectine induit peut-être des bouleversements dans l'expression des protéines de la famille Bcl-2, soit en augmentant l'expression des protéines pro-apoptotiques comme Bid et Bax ou en réduisant l'expression du Bcl-x_L ou de d'autres protéines anti-apoptotique.

Des études plus approfondies devront cependant être faites avant qu'il soit possible de se prononcer sur l'explication de l'augmentation de l'apoptose en présence de fibronectine.

3 MODULATION DES SIGNAUX DE SURVIE CELLULAIRE

3.1 Inhibition du signal des MAPK

Nous avons pu démontrer une activation de la voie des MAPK par le collagène de type I et nous l'avons associé à une protection contre l'apoptose. Afin de confirmer cette hypothèse, la modulation de ce signal nous permet de solidifier cette hypothèse. Une telle procédure a déjà été fait pour étudier le rôle du collagène sur la protection de lymphocyte T (Jurkat) contre l'apoptose. Deux inhibiteurs reconnus de l'activation des ERK1/2 ont été utilisés pour bloquer le signal induit par le collagène de type 1. Le PD98059 a réduit l'écart entre l'index apoptotique des cultures contrôles et sur collagène, alors que le U0126 a quant à lui complètement éliminé cet écart. Ceci est explicable par le fait que le PD98059 est un bloqueur compétitif et partiel, il permet donc tout de même une légère activation des ERK1/2. De son côté, le U0126 bloque complètement l'activation des ERK1/2 en se liant aux kinases responsables de leur activation ailleurs qu'au site de la réaction. Ces résultats démontrent bien que les ERK1/2 sont effectivement les effecteurs de la protection induite par le collagène. Sans leur activation, le collagène n'est pas en mesure de protéger les hépatocytes d'une stimulation apoptotique

L'utilisation du U0126 a causé une augmentation de l'index apoptotique autant lorsque les cellules étaient en présence de collagène

que si elles étaient en situation contrôle. Cette hausse peut s'expliquer par l'existence d'une faible stimulation des ERK1/2 dans les cultures contrôles sur plastique. Cette activité a d'ailleurs été observée par immunobuvardage. L'utilisation du U0126 vient complètement bloquer le signal des ERK1/2, le résultat ainsi obtenu correspondrait donc à l'index apoptotique des hépatocytes lorsqu'ils sont complètement dépourvus de l'activation de la voie des MAPK.

L'utilisation du U0126 nous a également permis de rétablir un élément important de la protection du collagène. En effet, les cultures sur collagène en présence de cet inhibiteur ont une expression de la principale protéine pro-apoptotique du foie, la protéine Bid, équivalente à celle observée dans les cellules contrôles. Les mêmes expériences sans le U0126 avaient démontré une réduction de 73% de l'expression de Bid sur collagène et l'inhibition du signal MAPK a éliminé cette réduction.

3.2 Souris transgéniques ERK1 knock-out

L'utilisation de souris transgéniques a permis d'étudier l'absence de signal MAPK sur la protection du collagène. ERK1 est malheureusement une des seules protéines que nous pouvons utiliser à l'aide d'un modèle de souris transgéniques. Les souris déficientes en ERK2 meurent très tôt *in utero*¹⁰¹ et les souris knock-out pour la sous-unité β_1 ³¹ des intégrines ne sont pas viables non plus. Également, personne ne semble avoir développé de souris n'exprimant pas l'intégrine α_1 . Les hépatocytes n'exprimant pas le gène de ERK1 ont tout de même démontré une perte complète de la protection par le collagène lors de stimulation apoptotique à l'anti-Fas *in vitro* démontrant ici aussi le rôle des MAPK dans la protection du collagène contre l'apoptose.

3.3 Saturation du signal MAPK

L'« Epidermal Growth Factor » est un puissant activateur de la voie des MAPK. Son utilisation sature le signal des MAPK, rendant ainsi négligeable l'effet du collagène sur les cellules, dont la stimulation est beaucoup plus faible que celle de l'EGF. L'EGF a un effet anti-apoptotique reconnu sur les hépatocytes. Cet effet est attribuable à une panoplie d'éléments mais notamment à une réduction de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bid¹⁰⁶. C'est donc sans surprise que des cultures sur collagène et sur plastique aient obtenu un index apoptotique plus faible en présence d'EGF. Il est toutefois intéressant de noter que les niveaux d'apoptose obtenus sont semblables pour les deux types de cultures. La différence dans la signalisation entre la culture sur collagène et sur plastique ne s'appliquant plus, le collagène n'a donc plus d'effet sur l'apoptose, ce qui concorde avec nos observations.

3.4 Voie de la PI3-K et de l'AKT

La voie de la PI3-K et de l'AKT (aussi appelée protéine kinase B) est une autre voie de signalisation importante pour les messagers provenant de l'extérieur de la cellule. Plusieurs facteurs de croissance, comme le PDGF, activent cette voie. Les effets de cette voie sont différents mais tout comme la voie des MAPK, plusieurs facteurs de transcriptions et autres protéines peuvent être activés et les signaux qui en découlent favorisent la survie de la cellule et le maintien de ses fonctions¹⁰⁷. Cette voie a été identifiée comme étant activée par certaines intégrines dans d'autre type cellulaire que l'hépatocyte¹⁰⁸. Cependant, des anticorps spécifiques à la version phosphorylée de l'AKT n'ont démontré aucune activation de cette voie lorsque les hépatocytes sont cultivées sur lit de collagène. Ni le collagène, ni la fibronectine n'ont pu activer cette voie de signalisation. De plus, l'utilisation de l'inhibiteur de cette voie

métabolique, le LY294002 n'a eu aucun effet sur l'apoptose des hépatocytes. La voie de la PI3-K et de l'AKT ne semble donc pas être impliquée dans la protection du collagène contre l'apoptose des hépatocytes.

4 Effet de la thioacétamide

4.1 Score de Ishak et dosage d'hydroxyproline

Nous avons utilisé ces deux techniques complètement différentes afin de mesurer l'étendue de la fibrose chez nos souris soumises à un traitement à la thioacétamide. La technique du pointage d'Ishak¹⁵ est une analyse morphologique de l'étendue globale de la fibrose. Cette technique est souvent utilisée comme outil diagnostique de fibrose à partir d'une biopsie hépatique chez l'humain. La coloration permet de faire ressortir les fibres de collagène qui s'étirent entre les rangées d'hépatocytes afin de bien pouvoir constater l'ampleur de la fibrose. Le dosage d'hydroxyproline est quant à lui une mesure quantitative du collagène dans un échantillon. L'hydroxyproline est un dérivé de l'acide aminé proline utilisée normalement dans la synthèse protéique. L'ajout du groupement hydroxyle est toutefois très caractéristique de la molécule de collagène. Ce groupement est essentiel à la conformation en triple hélice de la fibre de collagène¹⁰⁹. À part le collagène, seulement quelques protéines peuvent contenir de l'hydroxyproline, et celles-ci sont beaucoup moins abondantes. Il est donc reconnu que le dosage en hydroxyproline est une mesure quasi-directe du collagène. Il s'agit d'un dosage biochimique de groupements pyroles formés sur l'hydroxyproline par une réaction à froid

avec la chloramine T. La mesure de l'hydroxyproline est donc une mesure qui vise plus précisément le collagène.

4.2 Induction de la fibrose

La thioacétamide est utilisée pour induire la fibrose hépatique chez la souris ou chez le rat depuis déjà plus de 50 ans. Malgré cela, son mécanisme d'hépatotoxicité est encore mal défini. Il a été démontré que la thioacétamide nuisait aux enzymes nécessitant le cofacteur NADPH, comme les cytochromes P450, et qu'elle produisait un stress oxydatif et la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS). Son activité n'est pas comprise complètement, mais la thioacétamide est quand même très largement reconnu comme inducteur de fibrose hépatique. Nous avons pu en mesurer l'efficacité par nos mesures de fibrose ou de teneur en collagène des foies des souris soumis à un tel traitement. Un traitement chronique à la thioacétamide pendant 12 semaines a causé une fibrose hépatique importante alors que des souris contrôles soumis uniquement au vecteur, n'ont présenté aucune atteinte hépatique de ce genre. Par contre, un traitement de seulement un mois à la thioacétamide n'a pas causé de fibrose. L'effet fibrosante de la thioacétamide est donc le résultat d'une administration prolongée.

4.3 Période de récupération

L'état de fibrose induite par la thioacétamide nécessite toutefois la poursuite du traitement. En seulement deux semaines, en absence de traitement, les fibres de collagènes se résorbent et le foie récupère rapidement sa structure et sa morphologie normale¹². Nos analyses histologiques ont démontré le passage d'une fibrose importante à une

fibrose faible ne comportant que quelques septa fibreux entre des régions portales. Dans ce dernier cas, la présence de fibres de collagène est limitée aux hépatocytes avoisinant l'arborescence de la veine porte, mais ne concerne pas la totalité des cellules du foie. De façon quantitative, le niveau d'hydroxyproline a été significativement abaissé à un niveau légèrement plus élevé que les contrôles. Il n'existe toutefois pas de différence significative entre les souris contrôles et les souris fibrotiques ayant récupéré pendant 2 semaines.

5 Effet de la fibrose sur l'apoptose

5.1 Résistance aux injections d'anti-Fas

L'injection d'anti-Fas est un modèle établi d'atteinte aiguë du foie. L'anti-Fas induit une mort cellulaire massive par apoptose dans le foie en une très courte période de temps. Les premiers décès surviennent environ 5 heures après une injection à 0.5µg/g de poids corporel chez les souris Balb/c. Six heures après les injections, entre 50 et 60% des souris contrôles ou n'ayant pas de fibrose importante sont décédées. Par contre, les souris fibrotiques ayant subi 12 semaines d'injection à la thioacétamide ont toutes survécus au moins 6 heures aux injections d'anti-Fas. La fibrose a donc protégé les hépatocytes de la même façon que le collagène de type 1 dans nos tests *in vitro*.

La thioacétamide induisant une réaction inflammatoire dans le foie étant donné son effet cytotoxique, la présence d'inflammation aurait pu être considérée comme étant un élément protecteur contre l'apoptose. La présence de cytokines, et de plusieurs messagers liés à la défense de

l'organisme auraient pu contribuer à la protection du collagène. Toutefois, les souris ayant subi le traitement fibrogénique pendant un mois n'ont pas développé de fibrose, mais leur foie a été soumis à la même réaction inflammatoire que les souris traitées pendant 3 mois. Or, l'absence de résistance à l'injection d'anti-Fas dans ces souris démontre que le processus inflammatoire n'est pas impliqué dans la résistance des souris fibrotiques à l'apoptose induite par l'anti-Fas.

5.2 Activité MAPK dans les foies fibrotiques

L'immunobuvardage d'homogénat des foies des souris fibrotiques ont démontré une grande activité des ERK1/2. Cette activité n'est toutefois pas présente ni dans les souris contrôles, ni dans les souris ayant récupéré durant deux semaines avant leur sacrifice. Cette activation des MAPK semble liée à la présence de fibre de collagène dans l'environnement des hépatocytes et non au processus de guérison qui accompagne une telle atteinte. Face à une atteinte toxique, le foie tente de réagir et de guérir de cette atteinte. On pourrait croire que l'activation des MAPK, étant un signal de survie et de santé cellulaire, fasse partie du processus de guérison. Si c'était le cas, nous aurions dû percevoir une telle activité dans les foies ayant été traités à la thioacétamide mais ayant récupéré durant deux semaines. Dans ces cas, les mesures de fibrose indiquent que la guérison n'est pas complète. Elle est suffisamment avancée pour perdre l'effet protecteur de la fibrose, mais le processus de guérison n'étant pas terminé, nous aurions alors dû voir une activation des MAPK. L'activation des ERK1/2 semble donc véritablement due à la présence de collagène dans l'environnement des hépatocytes et non au processus de réparation du tissu hépatique.

5.3 Effet de la fibrose sur les protéines impliquées dans l'apoptose

L'expression de plusieurs protéines importantes dans la réaction apoptotique est modifiée par la présence de fibrose. Le changement le plus important se situe au niveau de la protéine Bcl-x_L qui est beaucoup plus exprimée dans les foies fibrotiques. La protéine pro-apoptotique Bax se retrouve elle aussi plus exprimée mais l'expression de la protéine Bid n'est pas modifiée par la fibrose. Les protéines pro et anti-apoptotiques se retrouvent donc toutes deux augmentées. Par contre, le ratio de la protéine Bcl-X_L sur la protéine Bax explique la protection induite par la fibrose. L'augmentation de la protéine anti-apoptotique est beaucoup plus importante (figure 21B), ce qui vient facilement contrebalancer l'augmentation dans l'expression de la protéine Bax.

L'expression de la protéine Bid n'est pas modulée en soi, mais son clivage est significativement réduit sous l'effet de la fibrose. Ceci contribue également à la protection offerte par le collagène dans le foie. De plus, cette variation est disparue chez les souris ayant récupéré de la fibrose. Il n'existe plus de différence entre les souris injectées au salin et à la thioacétamide lorsque les souris ont été sacrifiées deux semaines après la fin du traitement fibrogénique.

L'activation de la caspase-3 est elle aussi modulée par la fibrose hépatique. Son activité est en effet deux fois moins importante dans les foies fibrotiques. On peut également remarquer l'écart important dans l'activité basale de la caspase-3 sans stimulation apoptotique. Il s'agit d'une mesure de l'activité apoptotique normale du foie. La réduction fournie par le collagène suggère encore une fois une protection des hépatocytes contre l'apoptose sans même qu'il soit nécessaire de déclencher la réaction par un stimuli exogène.

6 IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

La fibrose hépatique étant considérée comme un élément pathologique, plusieurs thérapies éventuelles sont présentement en développement. La compréhension de la biopathologie de la fibrose, et tout ce qui concerne les cellules stellaires, étant relativement jeune, très peu de traitement s'offre présentement aux cliniciens. En effet, la seule véritable stratégie disponible présentement consiste à s'attaquer à la cause de la fibrose¹¹⁰. Toutefois, de nouvelles options sont présentement en développement, que ce soit des éléments comme la colchicine ou l'interleukin-10¹⁷. Ces nouvelles possibilités s'attaquent directement au processus de synthèse de collagène ou au processus de fibrogénèse et pourraient ainsi réduire de façon beaucoup plus efficaces la fibrose. Toutefois, les présents résultats démontrent que la fibrose peut être bénéfique pour le foie. Il serait donc préférable de contrôler le niveau de fibrose au lieu de tenter de l'éradiquer complètement. Éliminer la fibrose sans pour autant parvenir à contrôler l'élément fibrogène pourrait s'avérer dangereux, puisque ceci soumettrait les cellules hépatiques à un stress encore plus intense puisqu'il ne pourrait plus profiter de l'effet protecteur de la fibrose, tout en étant soumis à la même hépatotoxicité.

Il ne faut évidemment pas tomber dans l'autre extrême et laisser la fibrose prendre de l'expansion lors d'une maladie chronique du foie. La fibrose sévère, ou même la cirrhose, comporte des risques beaucoup plus graves pour l'ensemble de l'organisme, pour justifier une telle orientation. La fibrose offre effectivement une protection pour les hépatocytes, il faut cependant arriver à définir un niveau acceptable de fibrose pour maximiser ses effets favorables sans pour autant engendrer les effets

néfastes qui peuvent survenir lors de fibroses plus importantes. La présente étude ne s'est toutefois pas penchée sur ce sujet. Il est donc impossible pour l'instant de suggérer un niveau quel qu'il soit. D'autres recherches devront être faites avant de pouvoir se prononcer.

Conclusion

In vitro, le collagène de type 1 protège partiellement les hépatocytes contre l'apoptose par divers inducteurs. Cette protection est due à une activation des ERK1/2 et de la voie des MAPK. Cette activation produit des changements dans l'expression des protéines de la famille Bcl-2, dont notamment une réduction dans l'expression des protéines pro-apoptotique Bax et Bid. L'activité des caspases activatrices et effectrices est également réduite par la présence de collagène de type 1.

La fibronectine quant à elle, augmente la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose par un mécanisme qui demande encore à être élucidé.

In vivo, une fibrose hépatique induite par trois mois de thioacétamide a également protégé les hépatocytes contre l'apoptose induite par le récepteur Fas. La même activation de la voie des MAPK retrouvée *in vitro*, a été observée dans les foies fibrotiques. Cette activation a modifié l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en favorisant la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. L'activité de la caspase-3 effectrice a été réduite tout comme dans les études *in vitro*. Les effets protecteurs de la fibrose, et les modifications aux protéines impliquées dans l'apoptose, disparaissaient lorsque les souris soumises au traitement fibrogénique ont pu récupérer pendant deux semaines avant leur sacrifice afin de réduire considérablement la teneur en collagène de leur foie.

La modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 diffère entre notre modèle de fibrose hépatique et nos cultures d'hépatocytes primaires, mais il demeure que le collagène de type 1 est un élément protecteur pour les hépatocytes contre l'apoptose, tant *in vitro* que *in vivo*.

Bibliographie

1. Gressner, AM. & Bachem, MG. *Semin Liver Dis* 10, 30-46 (1990).
2. Rojkind, M., Giambrone, MA. & Biempica, L. *Gastroenterology* 76, 710-719 (1979).
3. Khuroo, MS. & Farahat, KL. *Liver Transpl* 10, 1099-1106 (2004).
4. Clement, B., Grimaud, J.A., Champion, J.P., Deugnier, Y. & Guillouzo, A. *Hepatology* 6, 225-234 (1986).
5. Rescan, PY., Loreal, O., Hassell, JR., Yamada, Y., Guillouzo, A. & Clement, B. *Am J Pathol* 142, 199-208 (1993).
6. Scuppan, D. & Gressner, AM. in *Oxford textbook of Clinical Hepatology* (eds Bircher, J., Benhamou, JP., McIntyre, N., Rizzetto, M. & Rodés, J.) Vol. Second Edition, 381-407 (Oxford University Press, New York, 1999).
7. Musso, O., Rehn, M., Saarela, J., et al. *Hepatology* 28, 98-107 (1998).
8. Charlton, M., Ruppert, K., Belle, SH., et al. *Liver Transpl* 10, 1120-1130 (2004).
9. Ueno, Y., Moriyama, M., Uchida, T. & Arakawa, Y. *Hepatology* 33, 357-362 (2001).
10. Fang, Y., Han, SI., Mitchell, C., et al. *Hepatology* 40, 961-971 (2004).
11. Gujral, JS., Liu, J., Farhood, A. & Jaeschke, H. *Hepatology* 40, 998-1007 (2004).
12. Song, Z., Zhou, Z., Uriarte, S., et al. *Hepatology* 40, 989-997 (2004).
13. Regev, A., Molina, E., Moura, R., et al. *Liver Transpl* 10, 1233-1239 (2004).
14. Firpi, RJ., Abdelmalek, MF., Soldevila-Pico, C., et al. *Liver Transpl* 10, 1240-1247 (2004).
15. Sala, M., Fuster, J., Llovet, JM., et al. *Liver Transpl* 10, 1294-1300 (2004).

16. Mendez-Sanchez, N., Almeda-Valdes, P. & Uribe, M. *Ann Hepatol* 4, 32-42 (2005).
17. Martin, P., Busuttil, RW., Goldstein, RM., et al. *Liver Transpl* 10, 1258-1262 (2004).
18. Ambrose, AM., DeEds, F. & Rather, LJ. *Proc Soc Exp Biol Med* 74, 132-134 (1950).
19. Chang, ML., Yeh, C., Chang, P. & Chen, J. *World J Gastroenterol* 11(27), 4167-4172 (2005).
20. al-Bader, A., Matthew, T., Koursheed, M., Asfar, S., al-Sayer, H. & Dashti, H. *Anat Histol Embryol* 29(1), 3-8 (2000).
21. Latha, SM., Pai, MR. & Pai, PK. *Indian J Physiol Pharmacol* 47(4), 476-478 (2003).
22. Wasser, S. & Tan, CE. *Ann Acad Med Singapore* 28(1), 108-111 (1999).
23. Low, TY., Leow, CK., Salto-Tellez, M. & Chung, M. *Proteomics* 4(12), 3960-3974 (2005).
24. Kleinfeld, RG. & Von Haam, E. *J Biophysic and Biochem Cytol* 6(3), 393-401 (1959).
25. Spira, B. & Raw, I. *Comp Biochem Physiol* 135, 129-135 (2003).
26. Kojima, T., Sawada, N., Zhong, Y., Oyamada, M. & Mori, M. *Virchows Arch* 425(4), 407-412 (1994).
27. Spira, B. & Raw, I. *Mol and Cell Biochem* 211, 103-110 (2000).
28. Satyabhama, S. & Padmanaban, G. *Biochem J* 218(2), 371-377 (1984).
29. Honda, H., Ikejima, K., Hirose, M., et al. *Hepatology* 36, 12-21 (2002).
30. Vander Flier, A. & Sonnenberg, A. *Cell Tissue Res* 305, 385-398 (2001).
31. Fässler, R. & Meyer, M. *Genes Dev* 9, 1896-1908 (1995).

32. Stupack, DG. & Cheresch, DA. *Curr Top Dev Biol* 64, 207-238 (2004).
33. Schuppan, D. & Ocker, M. *Hepatology* 38(2), 289-291 (2003).
34. Matsumoto, K., Ziober, BL., Yao, CC. & Kramer, RH. *Cancer Metastasis Rev* 14(3), 205-217 (1995).
35. Stomatoglou, SC. & Hughes, RC. *FASEB J* 8(6), 420-427 (1994).
36. Sanchez, A., Alvarez, AM., Pagan, R., et al. *J Hepatol* 32, 242-250 (2000).
37. Bhadriraju, K. & Hansen, LK. *Biomaterials* 21, 267-271 (2000).
38. Stupack, DG. & Cheresch, DA. *J Cell Sci* 115, 3729-3738 (2002).
39. Pinzani, M., Marra, F. & Carloni, V. *Liver* 18(1), 2-13 (1998).
40. Zhou, X., Murphy, FR., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, JP. & Benyon, RC. *J Biol Chem* 279(23), 23996-24006 (2004).
41. Nejari, M., Hafdi, Z., Gouysse, G., et al. *Hepatology* 36(2), 418-426 (2002).
42. Newsome, PN., Tsiaoussis, J., Masson, S., et al. *Hepatology* 40, 636-645 (2004).
43. Wu, Y., Nan, L., Bardag-Gorce, F., et al. *Exp Mol Pathol* 79(1), 1-8 (2005).
44. Playford, MP. & Schallor, MD. *Oncogene* 23(48), 7928-7946 (2004).
45. Baron, W., Colognato, H. & French-Constant, C. *Glia* 49(4), 467-479 (2005).
46. Comoglio, PM., Boccaccio, C. & Trusolino, L. *Curr Opin Cell Biol* 15(5), 565-571 (2003).
47. DeMali, KA., Wennerberg, K. & Burridge, K. *Curr Opin Cell Biol* 15(5), 572-582 (2003).
48. Grossmann, J. *Apoptosis* 7, 247-260 (2002).
49. Parsons, J. *J Cell Sci* 116 (pt 8), 1409-1416 (2003).

50. Schliess, F., Reissmann, R., Reinher, R., vom Dahl, S. & Haussinger, D. *J Biol Chem* 279(20), 21294-21301 (2004).
51. Crowe, DL. & Ohannessian, A. *BMC Cancer* 4(1), 18(2004).
52. Juliano, R., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A. & Aplin, A. *Biochem Soc Transactions* 32, 443-446 (2004).
53. Cowan, KJ. & Storey, KB. *J Exp Biol* 206, 1107-1115 (2003).
54. Schwartz, MA. & Assoian, RK. *J Cell Sci* 114, 2553-2560 (2001).
55. Wilkinson, MG. & Millar, J. *FASEB J* 14, 2147-2157 (2000).
56. O'Neill, E. & Kolch, W. *Brit J Cancer* 90, 283-288 (2004).
57. Eisenmann, KM., VanBrocklin, MW., Staffend, NA., itchen, SM. & Koo, HM. *Cancer Res* 63(23), 8330-8337 (2003).
58. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., et al. *Nature* 364, 806-809 (1993).
59. Zender, L. & Kubicka, S. *Apoptosis* 9(1), 51-54 (2004).
60. Feldmann, G. *J Hepatol* 26 Suppl 2, 1-11 (1997).
61. Ni, R., Tomita, Y., Matsuda, K., et al. *Exp Cell Res* 215, 332-337 (1994).
62. Chang, BJ., Nishikawa, N., Sato, E. & Inoue, N. *Arch Biochem Biophysics* 411, 63-72 (2003).
63. Aoki, K., Kurooka, M., Chen, JJ., Petryniak, J., Nabel, EG. & Nabel, GJ. *Nat Immunol* 2, 333-337 (2001).
64. Jones, BE., Lo, CR., Liu, H., et al. *J Biol Chem* 275, 705-712 (2000).
65. Hatano, E. & Brenner, DA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6), G1357-G1368(2001).
66. Matsuzaki, H., Schmied, BM., Ulrich, A., et al. *Clin Cancer Res* 7, 407-411 (2001).
67. Hentze, H., Latta, M., Kunstle, G., et al. *Hepatology* 39, 1311-1320 (2004).

68. Wajant, H. *Essays Biochem* 39, 53-71 (2003).
69. Curtin, JF. & Cotter, TG. *Cell Signal* 15(11), 983-992 (2003).
70. Barnhart, BC., Alappat, EC. & Peter, ME. *Semin Immunol* 15(3), 185-193 (2003).
71. Yin, XM. *J Mol Med* 78(4), 203-211 (2000).
72. Kelekar, A. & Thompson, CB. *Trends Cell Biol* 8(8), 324-330 (1998).
73. Chan, SL. & Yu, VC. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(3), 119-128 (2004).
74. Lutz, RJ. *Biochem Soc Trans* 28(2), 51-56 (2005).
75. Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK & Yin XM. *J Biol Chem* 275, 39474-39481 (2000).
76. Crompton C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 414-419 (2000).
77. Zamzami N, El Hamel C, Maise C, et al. *Oncogene* 19, 6342-6350 (2000).
78. Scarabelli, TM., Stephanou, A., Pasini, E., et al. *J Am Coll Cardiol* 43(5), 865-874 (2004).
79. Lim, ML., Lum, MG., Hansen, TM., Roucou, X. & Nagley, P. *J Biomed Sci* 9 (6 Pt 1), 488-506 (2002).
80. Cain, K. *Drug Metab Rev* 35(4), 337-363 (2003).
81. Li S, Zhao Y, He X, et al. *J Biol Chem* 277, 26912-26920 (2002).
82. Musallam, L., Éthier, C., Haddad, PS. & Bilodeau, M. *J Cell Physiol* 198, 62-72 (2003).
83. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., et al. *Science* 278 (5336), 294-298 (1997).
84. Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., et al. *Cancer* 95(4), 896-906 (2005).
85. Pinkse, G., Voorhoeve, MP., Noteborn, M., Terpstra, OT., Bruijn, JA. & de Heer, E. *Liver International* 24, 218-226 (2004).

86. Pinkse, G., Jiawan-Lalai, R., Brujin, JA. & de Heer, E. *J Hepatol* 42, 87-93 (2005).
87. Fouquet, S., Lugo-Martinez, VH., Faussat, AM., et al. *J Biol Chem* 279(41), 43061-43069 (2004).
88. Vachon, PH., Harnois, C., Grenier, A., et al. *Gastroenterology* 123(6), 1980-1991 (2002).
89. Fernandez, Y., Gu, B., Martinez, A., Torregrosa, A. & Sierra, A. *Int J Cancer* 101(4), 317-326 (2002).
90. Peruzzi, F., Prisco, M., Dews, M., et al. *Mol Cell Biol* 19(10), 7203-7215 (1999).
91. Reginato, MJ., Mills, KR., Paulus, JK., et al. *Nat Cell Biol* 5, 733-740 (2003).
92. Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, LA., et al. *Science* 293, 1829-1832 (2001).
93. Gendron, S., Couture, J. & Aoudjit, F. *J Biol Chem* 278(49), 48633-48643 (2003).
94. Aoudjit, F. & Vuori, K. *J Cell Biol* 152, 633-643 (2001).
95. Zhang, H., Osaki, I., Mizuta, T., et al. *Cancer Sci* 95(11), 878-886 (2004).
96. Sautin, YY., Crawford, JM. & Svetlov, SI. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(6), C2010-C2019(2001).
97. Kivirikko, KI., Laitinen, O. & Prockop, DJ. *Anal Biochem* 19(2), 249-255 (1967).
98. Nagatani, Y., Muto, Y., Sato, H. & Iijima, M. *Yakugaku Zasshi* 106 (1), 41-46 (1986).
99. Sakaida, I., Jinhua, S., Uchida, K., Terai, S. & Okita, K. *Life sciences* 73, 2491-2501 (2003).
100. Bradford, MM. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976).
101. Saba-El-Leil, MK., Vella, FD., Vernay, B., et al. *EMBO Rep* 4(10), 964-968 (2003).

102. Park, WY., Cho, K., Park, JS., Kim, D. & Park, SC. *Ann N Y Acad Sci* 928, 79-84 (2001).
103. Roberts, R., James, N. & Cosulich, S. *Hepatology* 31, 420-427 (2000).
104. Grad, JM., Zeng, XR. & Boise, LH. *Curr Opin Oncol* 12(6), 543-549 (2000).
105. Kroemer, G. *Biochem Soc Symp* 66, 1-15 (1999).
106. Éthier, C., Raymond, VA., Musallam, L., Houle, R. & Bilodeau, M. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G298-G308(2003).
107. Mitsiades, CS., Mitsiades, N. & Koutsilieris, M. *Curr Cancer Drug Targets* 4(3), 235-256 (2004).
108. Alahari, SK., Reddig, PJ. & Juliano, RL. *Int Rev Cytol* 220, 145-184 (2002).
109. Bhattacharjee, A. & Bansal, M. *IUBMB Life* 57(3), 161-172 (2005).
110. Murphy, F., Arthur, M. & Iredale, J. *Expert Opin Investig Drugs* 11(11), 1575-1585 (2002).
111. Vacquero, EC., Edderkaoui, M., & Gukovskaya, AS. *Gastroenterology* 125(4):1188-202 (2003)
112. Armstrong, T., Packham, G., & Iredale, JP. *Clin Cancer Res* 10(21):7427-37 (2004)
113. Tippelt, S., Ma, C., Witt, M., & Funk, RH. *Cell Tissues Organs* 177(1)29-36 (2004)
114. He, Y., Chen, J., Ren, J., Wang, G., & Cai, G. *J Biochem (Tokyo)* 132(3):373-9 (2003)
115. Gendron, S., Couture, J., Aoudjit, F. *J Biol Chem* 278(49)48633-43(2003)