

Université de Montréal

**La combinaison de l'UDCA ou du NCX-1000 avec des
antioxydants liposolubles procure une meilleure protection
aux hépatocytes de souris contre la toxicité de l'amiodarone**

Par

Amine Ouazzani Chahdi

Département de Pharmacologie

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 Pharmacologie

Décembre 2004

© Amine Ouazzani Chahdi, 2004



W

4

U58

2005

V.051

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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**La combinaison de l'UDCA ou du NCX-1000 avec des
antioxydants liposolubles procure une meilleure protection
aux hépatocytes de souris contre la toxicité de l'amiodarone**

Présenté par :

Amine Ouazzani Chahdi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marc Bilodeau, Président-rapporteur

Dr. Jean Spénard, Membre du jury

Dr. Pierre Haddad, Directeur de recherche

SOMMAIRE

La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une maladie du foie caractérisée par la stéatose, l'inflammation et la fibrose au niveau du foie. Jusqu'à présent, il n'existe aucun traitement efficace pour cette maladie. La pathogénèse du NASH n'est pas encore parfaitement définie. La théorie la plus acceptée jusqu'à présent implique deux attaques, la première étant la stéatose, qui rendrait le foie plus sensible à la seconde attaque par le stress oxydatif et qui mènerait à des lésions de stéatohépatite.

La présente étude a permis de mettre en évidence l'importance du stress oxydatif et de la dysfonction mitochondriale dans un modèle *in vitro* de cultures primaires d'hépatocytes de souris. Ces cellules ont été traitées avec de l'amiodarone afin de mimer les lésions cellulaires observées dans le NASH. La toxicité de l'amiodarone se manifeste par la nécrose cellulaire ainsi que par des changements morphologiques dans les cellules. Les résultats tirés de cette étude suggèrent que l'acide ursodéoxycholique (UDCA) et son dérivé, le NCX-1000, protègent les hépatocytes contre la toxicité de l'amiodarone, le NCX-1000 étant plus efficace à cet égard. De plus, contrairement aux antioxydants hydrosolubles, la vitamine E démontre un effet protecteur contre la mort cellulaire induite par l'amiodarone, suggérant que la nature lipophile des antioxydants est nécessaire dans ce contexte. Finalement, la combinaison de l'UDCA ou du NCX-1000 avec la vitamine E, mais non avec les antioxydants hydrosolubles, a résulté en une meilleure protection des hépatocytes de souris contre la toxicité de l'amiodarone et cet effet a été plus prononcé avec le NCX-1000. À la lumière de ces résultats, on est en mesure de proposer une stratégie thérapeutique intéressante combinant un agent cytoprotecteur, le NCX-1000 et un antioxydant liposoluble, qui pourrait s'avérer efficace dans la prévention du NASH chez l'humain.

Mots clés : NASH, UDCA, NCX-1000, vitamine E, stress oxydatif, peroxydation des lipides, nécrose, apoptose

1.4. LES MODÈLES ANIMAUX DE LA STÉATOHÉPATITE NON ALCOOLIQUE	18
1.4.1. MODÈLE DE TOXICITÉ DE L' AMIODARONE	19
1.4.2. SOURIS GÉNÉTIQUEMENT OBÈSES (Ob/Ob)	21
1.4.3. LE MODÈLE DES SOURIS NOURRIES AVEC UNE DIÈTE DÉFICIENTE EN CHOLINE ET EN MÉTHIONINE	22
1.5. BUT DE L'ÉTUDE	23
CHAPITRE II : PRÉSENTATION DU MANUSCRIPT	25
2.1 ABSTRACT	27
2.2 INTRODUCTION	28
2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES	31
2.4 RESULTS	34
2.5 DISCUSSION	38
2.6 REFERENCES	42
2.7 FIGURE LEGENDS	45
2.8 FIGURES	47
2.8 ACKNOWLEDGEMENTS	52
CHAPITRE III : DISCUSSION	53
CHAPITRE IV : CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des études publiées pour le traitement du NASH	14
---	----

LISTE DES FIGURES**CHAPITRE I**

- Figure 1 : Système de classification des maladies de la stéatose hépatique non alcoolique 2
- Figure 2 : Caractéristiques histologiques de la stéatohépatite non alcoolique 4
- Figure 3 : Modèle des deux attaques de la pathogenèse du NASH 5
- Figure 4 : Mécanismes sous-jacents à la stéatose hépatique 9
- Figure 5 : Photographie en microscopie électronique des inclusions para-cristallines et des méga-mitochondries chez un patient souffrant du NASH 12
- Figure 6 : Structure moléculaire de l'amiodarone 19
- Figure 7 : Diagramme schématisant le lien entre le stress oxydatif, la résistance à l'insuline et le TNF- α 22

CHAPITRE II

- Figure 8 : Dose dependant effect of amiodarone on hepatocytes viability 46
- Figure 9: Concentration dependant effect of UDCA and NCX-1000 on the viability of amiodarone-treated cells 47

Figure 10: The concentration dependant effect of vitamin E, BHT and vitamin C on the viability of amiodarone-treated cells	47
Figure 11: The effect of UDCA, NCX-1000, vitamin E, and their combination on the viability of amiodarone-treated cells	48
Figure 12: The effect of BHT and vitamin C alone or in combination with UDCA or NCX-1000 on the viability of amiodarone-treated cells	49
Figure 13: The effect of UDCA, NCX-1000, BHT, vitamin C, and vitamin E on the increase of superoxide anion production induced by amiodarone	50
Figure 14: The concentration-dependent effect of amiodarone on MDA concentration in hepatocytes	50
CHAPITRE III	
Figure 15: Mécanisme de toxicité de l'amiodarone dans les hépatocyte et similarités avec le modèle des deux attaques de la pathophysiologie du NASH	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE	4-Hydroxynonéal
AGL	Acides gras libres
ALT	Alanine amino-transférase
AMD	Amiodarone
ATP	Adénosine triphosphate
BHT	Butylhydroxytoluène
GLUT-4	Transporteur de glucose 4
HO	Hoechst 33342
I κ K β	Kinase inhibitrice kappa beta
IR	Insulino-résistance
IRS-1	Substrat du récepteur de l'insuline 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MDA	Malondialdéhyde
NASH	Stéatohépatite non alcoolique
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa beta
NO	Monoxyde d'azote
PI	Iodure de propidium
PKC	Protéine Kinase C
PPAR- γ	Récepteur γ activé par la prolifération des peroxysomes
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAMe	S-adenosylméthionine
SNP	Nitroprusside de sodium
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
TUNEL	TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick end labelling)
UDCA	Acide ursodéoxycholique
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Haddad, pour son précieux support académique et son génie ainsi que pour m'avoir accordé les nombreuses opportunités de présenter mes travaux à divers congrès scientifiques. Je tiens aussi à remercier Axcan Pharma pour leur soutien financier et leurs idées innovatrices qui m'ont permis de mener ce projet à terme.

Je voudrais également témoigner une reconnaissance toute spéciale à l'égard d'Antoine Brault pour son expertise et son soutien technique au cours de cette dernière année. Un grand merci à Diane Vallerand qui a toujours su nous fournir tout le support technique nécessaire au bon déroulement du projet.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner mes amis et collègues de travail qui ont quotidiennement partagé deux belles années de ma vie et qui ont installé un climat de travail extraordinaire dans le laboratoire.

De plus, je désire remercier tous ceux qui ont collaboré au projet, Dr Aziz Elimadi, Dr Allal Chabli et Dr Patrick Colin, sans qui, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Enfin, un grand merci à toute ma famille pour leur support inconditionnel tout au long de mes études.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

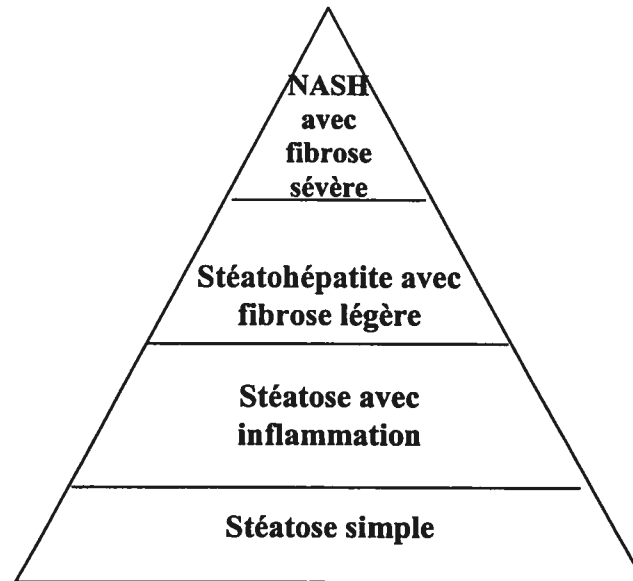
1.1. DESCRIPTION DE LA PATHOLOGIE

Les populations des pays développés sont touchées par une épidémie d'obésité de plus en plus préoccupante. Cette épidémie est principalement due à de mauvaises habitudes de vie telles qu'une diète trop riche en gras et en sucre ainsi qu'un important manque d'exercice. En 1952, un article du New York Times a souligné que l'obésité représentait le problème de santé numéro un de notre société. Aujourd'hui, cette situation s'est aggravée de près de 400 %, touchant maintenant entre 10 et 25 % de la population occidentale^(1,2). Cette épidémie d'obésité est accompagnée d'une augmentation de la prévalence de l'insulino-résistance (IR), du diabète, de l'hyperlipidémie et de l'hyperglycémie, qui sont tous des caractéristiques du syndrome métabolique⁽³⁾. En plus de ce dérèglement du métabolisme, on note aussi l'augmentation de la prévalence de la stéatose hépatique, qui est caractérisée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques au sein du cytoplasme des hépatocytes. Cette stéatose représente le premier grade des maladies de la stéatose hépatique non alcoolique, mieux connues sous le terme anglais « Non Alcoholic Fatty Liver Diseases » ou « NAFLD ». Chez certains patients, cette stéatose hépatique demeure isolée et sans lésions hépatocellulaires. Cependant, chez un autre groupe de patients, elle peut induire une certaine nécrose hépatocytaire, une infiltration de cellules immunitaires dans le foie ainsi que le développement d'une fibrose hépatique, qui aboutira dans certains cas en une cirrhose. Ces lésions du foie sont histologiquement semblables à celles observées chez des patients alcooliques et caractérisent le dernier grade des NAFLD, la stéatohépatite non alcoolique.

Les maladies de la stéatose hépatique non alcoolique représentent donc une large gamme de désordres hépatiques s'échelonnant de la stéatose simple à la stéatohépatite non alcoolique (voir *Figure 1*)^(4,5) mieux connue sous le terme anglais « Non Alcoholic Steatohepatitis » d'où l'acronyme « NASH ». La stéatose hépatique en elle-même est une condition bénigne et non progressive, tandis que la stéatohépatite non alcoolique peut progresser vers une fibrose hépatique et même, dans certains cas, vers une cirrhose. Jusqu'à présent, il n'existe aucun moyen sensible et non invasif pour différencier ces deux entités

car elles sont cliniquement et radiologiquement similaires. Malgré le fait que le NASH se caractérise souvent par des niveaux élevés de transaminases hépatiques, une biopsie du foie est nécessaire pour établir le diagnostic avec exactitude⁽⁵⁾.

Figure 1 : Système de classification des NAFLD : 4 niveaux qui dépendent de la sévérité des lésions hépatiques^(4,5).



La stéatohépatite non alcoolique a été décrite pour la toute première fois en 1962 et a été caractérisée en 1980 par le médecin pathologiste J. Ludwig et ses collaborateurs de la Clinique Mayo de Rochester. Ces auteurs avaient observé des lésions de stéatohépatite alcoolique incluant la présence de stéatose, de nécrose hépatocytaire, d'infiltration de cellules inflammatoires, de corps de Mallory et de la fibrose (voir *Figure 2*), chez vingt patients ne consommant pas ou peu d'alcool et ne souffrant pas d'autres maladies hépatiques⁽⁶⁾. Avant 1994, la stéatohépatite non alcoolique était encore considérée comme étant une condition peu commune touchant presque exclusivement les femmes obèses souffrant de diabète de type II et dont le pronostic était relativement bénin⁽⁷⁾. De ce fait, peu d'attention y était accordée et aucune recherche expérimentale ou clinique visant à la traiter n'a été rapportée. Cependant en 1994, cette perception a été défiée par une série de publications indiquant que le NASH était le diagnostic le plus commun chez les patients

présentant des anomalies persistantes aux tests hépatiques. Depuis lors, il est devenu de plus en plus clair que cette maladie se distribue également chez les deux sexes et qu'une partie des patients ne sont ni obèses, ni diabétiques⁽⁷⁾. De plus, un article de James et collaborateurs paru en 1998, a rapporté que des cas de fibrose et de cirrhose hépatique étaient observés chez 15 à 50 % des patients souffrant du NASH, suggérant ainsi que certains patients pouvaient développer des maladies hépatiques graves et progressives⁽⁸⁾. Depuis ce temps, on a noté une augmentation exponentielle du nombre d'études sur les différents aspects de cette maladie afin de mieux en comprendre la cause, la pathogénèse et le pronostic. Le NASH est donc devenu l'une des maladies du foie les plus fréquentes dans la population occidentale. En effet, une étude récente révèle que le NASH touche entre 2.1 et 6.3 % de la population générale et ces proportions sont de 9 à 40 % chez les individus obèses, ce qui en fait la maladie chronique du foie la plus répandue dans les pays occidentaux^(9,10). Parmi les principaux facteurs de risque de cette maladie, on retrouve l'obésité, le diabète de type II et l'hyperinsulinémie.

On peut distinguer deux types de NASH selon l'origine des lésions hépatiques. Dans les cas où les lésions sont dues à des désordres tels que le syndrome métabolique, le NASH est considéré de type primaire⁽¹⁰⁾. Cependant, cette maladie peut également être induite par certains médicaments qui altèrent la fonction mitochondriale tels que l'amiodarone, le tamoxifène et certains antirétroviraux. Elle peut aussi se retrouver chez les patients souffrant de la maladie de Wilson ou chez les personnes ayant subi un pontage jejuno-iléal ou une gastroplastie. Dans ces derniers cas, le NASH est considéré de type secondaire⁽¹⁰⁾.

Figure 2 : Caractéristiques histologiques de la stéatohépatite non alcoolique : Présence de stéatose micro et macro-vésiculaire, de corps de Mallory (M) d'hépatocytes ballonnés (B) et apoptotiques (A), dénotant des lésions cellulaires, ainsi que de la fibrose autour des sinusoides (CV).

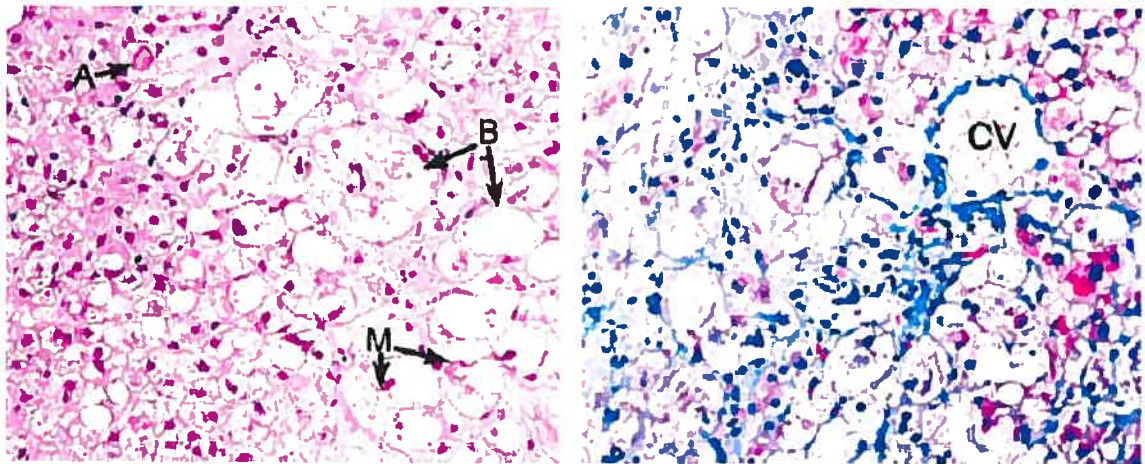


Figure tirée avec la permission de: Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37(5):1202-19.

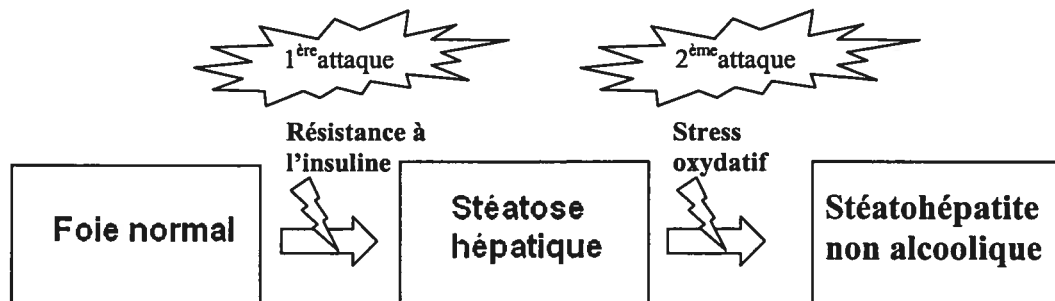
1.2. LA PATHOGENÈSE DU NASH

La pathogénèse de la stéatohépatite non alcoolique n'est pas encore clairement définie. Le développement de la stéatose, de la stéatohépatite, de la fibrose hépatique et de la cirrhose est fort probablement le résultat d'une multitude de désordres métaboliques ayant lieu dans un environnement génétique favorable. À ce jour, la théorie la plus plausible et qui tient compte de la plupart des éléments observés dans cette maladie est le modèle des deux attaques ou « two hit model » pour expliquer la pathogénèse du NASH.

1.2.1 LE MODÈLE DES DEUX ATTAQUES DE LA PATHOGENÈSE DU NASH

En 1998, Day et collaborateurs ont proposé l'hypothèse des deux attaques pour expliquer la pathogénèse du NASH⁽¹¹⁾ (voir *Figure 3*) et, jusqu'à ce jour, la grande majorité de la littérature existante appuie cette hypothèse. Ce modèle propose que la stéatose seule serait insuffisante pour initier les lésions de stéatohépatite, d'autres facteurs étant nécessaires pour déclencher le processus inflammatoire et fibrotique. Cette théorie implique que la résistance à l'insuline favorise l'augmentation de la lipolyse et de la génération d'acides gras libres pour leur estérification et leur oxydation hépatique. L'accumulation de ces graisses au niveau du foie et la stéatose qui en résulte, augmentent la vulnérabilité de l'organe aux diverses insultes secondaires, incluant le stress oxydatif et les cytokines inflammatoires, qui pourraient causer les lésions nécro-inflammatoires⁽¹²⁾ caractéristiques de la stéatohépatite non alcoolique.

Figure 3 : Modèle des deux attaques de la pathogénèse du NASH. La résistance à l'insuline induit la stéatose hépatique qui sensibilise le foie aux attaques subséquentes par le stress oxydatif qui vont engendrer des lésions de stéatohépatite.



1.2.1.1. LA PREMIÈRE ATTAQUE : LA STÉATOSE HÉPATIQUE

Selon ce modèle, la stéatose représente la première attaque que subit le foie. La stéatose est caractérisée par l'accumulation pathologique de graisses dans les hépatocytes excédant 5% du poids du foie. Elle peut être causée par des troubles métaboliques, nutritionnels ou endocriniens, ou par certains composés chimiques. Parmi les composés qui causent la stéatose hépatique on retrouve l'alcool, la tétracycline, la cortisone, l'amiodarone et plusieurs autres médicaments qui altèrent la fonction mitochondriale. Les causes nutritionnelles de la stéatose hépatique incluent la sous-alimentation, l'obésité, l'apport insuffisant en protéines ou le pontage intestinal chez certains individus obèses ou hyperlipidémiques. Les causes endocriniennes ou métaboliques de la stéatose hépatique comprennent le diabète juvénile de type I, le diabète non insulino-dépendant (type II) accompagné d'hyperinsulinémie, d'hyperglycémie et d'IR.

Un grand nombre d'études soulignent que 94 à 97 % des patients souffrant du NASH sont obèses et qu'entre 20 et 81 % d'entre eux souffrent de diabète non insulino-dépendant ou d'hyperglycémie. De plus, des études récentes indiquent que l'IR touche presque tous les patients avec des problèmes de stéatose hépatique, ce qui mène à l'hypothèse que le NASH, et les NAFLD en général, représentent la manifestation hépatique du syndrome métabolique.

La stéatose hépatique résulte d'anomalies de la physiologie de la synthèse et de la sécrétion des triglycérides et pourrait être causée par une augmentation de la libération d'acides gras à partir des tissus adipeux viscéraux, par une synthèse plus élevée d'acides gras, par une diminution de l'oxydation des acides gras ou par une anomalie de la sécrétion hépatique de triglycérides⁽¹³⁾.

1.2.1.1.1. RELATION ENTRE L'OBÉSITÉ, L'INSULINO-RÉSISTANCE ET LA STÉATOSE HÉPATIQUE :

L'IR est un élément commun chez les patients souffrant du NASH et semble jouer un rôle important dans la pathogénèse de cette maladie. L'insuline module la signalisation intra-cellulaire en activant au moins neuf voies de signalisation via l'activité tyrosine kinase de son récepteur. Dans les cas d'IR, les défauts au niveau du récepteur à l'insuline lui-même sont très rares. Cependant, les déficiences de l'une ou de plusieurs des voies de signalisation reliées à ce récepteur sont la cause de la majorité des états d'IR. L'un des mécanismes proposés pour expliquer l'origine de l'IR est la régulation à la baisse du substrat du récepteur à l'insuline-1 («Insulin Receptor Substrate-1» ou IRS-1) par l'excès d'acides gras libres⁽⁹⁾. En effet, grâce à des expériences utilisant la résonance magnétique nucléaire, il a été démontré que les acides gras libres perturbent la phosphorylation en tyrosine d'IRS-1, causant ainsi une diminution de la réponse à l'insuline^(14,15).

La sensibilité à l'insuline est également étroitement contrôlée par des médiateurs peptidiques. Le tissu adipeux, et plus particulièrement le tissu adipeux mésentérique, est une source importante de cytokines et d'hormones peptidiques agissant comme régulateurs des activités métaboliques dont le facteur de nécrose tumorale α (« tumor necrosis factor- α » ou TNF- α), l'angiotensinogène, la leptine et les éléments du complément⁽¹⁶⁾.

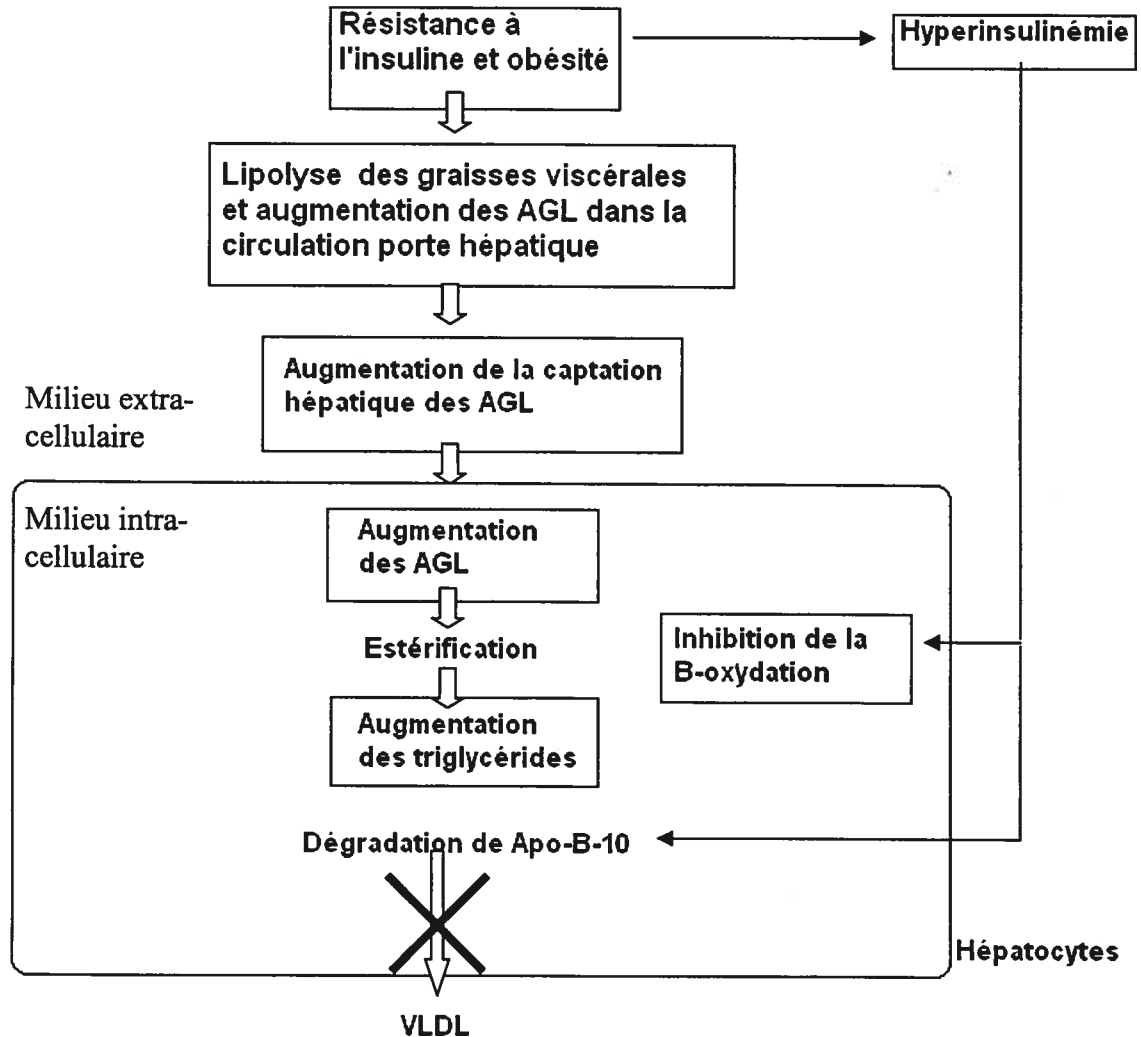
Le TNF- α agit comme régulateur de la sensibilité à l'insuline. Ce facteur réduit l'expression des protéines qui contrôlent la captation des acides gras libres (AGL) et la lipogénèse, menant ainsi à une augmentation des niveaux d'AGL circulants⁽¹⁶⁾. Le TNF- α diminue aussi l'expression de diverses protéines qui médient les effets de l'insuline, telles que la protéine de liaison des acides gras des adipocytes, *aP2* (Adipocyte fatty acid binding protein *aP2*), l'adiposine ainsi que le transporteur de glucose sensible à l'insuline, le GLUT-4. De plus, le TNF- α favorise la résistance insuline en diminuant l'expression du récepteur γ de la prolifération des peroxyosomes (« peroxisome proliferator activated receptor gamma» ou PPAR γ), un récepteur nucléaire jouant un rôle primordial dans le maintien d'une sensibilité normale à l'insuline.

De plus, chez les patients souffrant du NASH, les niveaux de TNF- α plasmatiques semblent être en corrélation directe avec le degré d'obésité abdominale ainsi qu'avec le degré d'hyperinsulinémie. Le TNF- α constitue donc le candidat idéal pour relier la masse adipeuse corporelle à la résistance à l'insuline. Par ailleurs, plusieurs études animales ont démontré l'absence du développement de l'IR chez des souris chez qui l'obésité a été induite et dont le gène codant pour le TNF- α a été supprimé⁽¹⁷⁾. Il est aussi suggéré que le TNF- α jouerait un rôle dans la régulation à la baisse de IRS-1 en stimulant sa phosphorylation en serine via les protéines JNK, PKC et I κ K β ⁽¹⁸⁾.

La leptine est un autre médiateur peptidique synthétisé par les adipocytes qui jouerait un rôle important dans la régulation de la répartition des lipides entre la β -oxydation mitochondriale et la synthèse des triglycérides. Des défauts dans la synthèse ou la signalisation de la leptine, tels que rencontrés chez les souris Ob/Ob, sont associés à une accumulation de graisses et une inhibition de la β -oxydation mitochondriale au niveau du foie⁽¹⁹⁾. De plus, il a aussi été suggéré que la leptine serait nécessaire au développement de la fibrose hépatique chez les patients souffrant du NASH⁽¹⁹⁾.

Dans un état post-prandial normal, l'insuline bloque la lipolyse des tissus adipeux et inhibe la β -oxydation mitochondriale des AGL afin d'en synthétiser des triglycérides qui seront emmagasinés dans le cytoplasme et exportés sous forme de lipoprotéines de très faible densité («very low density lipoprotein» ou VLDL) vers les tissus périphériques. En présence de résistance à l'insuline, la lipolyse des tissus adipeux n'est pas inhibée par l'insuline, résultant en une mobilisation des AGL de la graisse viscérale et leur transport via la circulation porte vers le foie. Par conséquent, le foie capte plus d'AGL et, afin de maintenir l'équilibre intracellulaire, augmente la β -oxydation mitochondriale et l'exportation des AGL vers la circulation sanguine sous la forme de VLDL. Par ailleurs, l'hyperinsulinémie cause l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale et la dégradation intracellulaire de l'apolipoprotéine B-10, composante des VLDL requise pour leur exocytose⁽²²⁾. Par conséquent, la balance nette tend vers une accumulation intracellulaire des acides gras libres et des triglycérides dans les hépatocytes, menant à une stéatose hépatique (voir *Figure 4*).

Figure 4 : Mécanismes sous-jacents à la stéatose hépatique résultante de l'insulino-résistance.



Selon le modèle des deux attaques, la stéatose hépatique jouerait un rôle prépondérant dans le développement et la progression du NASH. En effet, un foie surchargé en lipides constitue un environnement favorable pour la perpétuation du stress oxydatif menant à des lésions nécro-inflammatoires et fibrotiques. De plus, une nette association entre la sévérité de la stéatose et le risque de lésions hépatocytaires et de fibrose a été notée dans plusieurs études démontrant un rôle potentiellement nocif de la stéatose⁽²³⁾.

1.2.1.2. LA SECONDE ATTAQUE : *LE STRESS OXYDATIF*

De plus en plus de données confirment que le stress oxydatif et la peroxydation des lipides jouent un rôle central dans l'induction des lésions de stéatohépatite au cours du développement du NASH. En effet, plusieurs études ont démontré la présence de protéines oxydées ou de dérivés lipidiques peroxydés tant chez des modèles animaux que chez des patients souffrant du NASH^(24,25). Les modèles animaux de stéatohépatite suggèrent que la surcharge en acides gras libres disponibles pour la β -oxydation mitochondriale pourrait causer une augmentation de leur oxydation et stimuler la respiration mitochondriale. Puisque l'activité de la mitochondrie représente la source majeure de production des espèces radicalaires de l'oxygène communément appelés radicaux libres («reactive oxygen species» ou ROS). Une augmentation de la disponibilité en combustible va induire une production excessive de radicaux libres⁽²³⁾. Les espèces radicalaires ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) et non radicalaires de l'oxygène (H_2O_2) peuvent générer des dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN cellulaire et finalement induire la mort cellulaire ainsi que des lésions nécro-inflammatoires. D'autres sources de stress oxydatif ont aussi été suggérées dont le cytochrome P-450, la β -oxydation peroxisomale et les cellules inflammatoires activées.

Un foie stéatosique représente un environnement très favorable au développement et au maintien du stress oxydatif. Au cours de la peroxydation lipidique, un nombre important d'aldéhydes sont formés par cassure des hydroperoxydes lipidiques. La plupart de ces aldéhydes sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux engendrés par les radicaux libres. Les aldéhydes les mieux étudiés sont le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA). Ces derniers peuvent se lier de façon covalente aux protéines hépatiques pour former des adduits capables d'initier une réponse immunitaire potentiellement nuisible. Ces produits peuvent aussi interagir avec la chaîne respiratoire mitochondriale et nuire au transfert des électrons. Ceci résulte en un cycle vicieux de formation de radicaux libres causant encore plus de peroxydation des lipides et de dommages cellulaires. De plus, ces aldéhydes peuvent stimuler la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire par les cellules stellaires hépatiques et lier les protéines de cytokératine pour former les corps de

Mallory, en plus de stimuler les neutrophiles à déclencher une réaction inflammatoire⁽²⁷⁾. En effet, les radicaux libres peuvent induire l'expression de diverses cytokines inflammatoires incluant le facteur de croissance transformant beta («transforming growth Factor β » ou TGF- β), l'interleukine-8, le TNF- α et le ligand Fas⁽²⁷⁾. Ainsi, les produits de la peroxydation lipidique et les cytokines semblent jouer un rôle dans l'induction des lésions de stéatohépatite. De ce fait, le stress oxydatif est un candidat de choix pour expliquer les caractéristiques histologiques du NASH ainsi que la seconde attaque causant les lésions de stéatohépatite dans le foie stéatosique.

Afin de se protéger contre le stress oxydatif, toutes les cellules hépatiques possèdent un système de défense contre les radicaux libres. Ces systèmes endogènes antioxydants comprennent des mécanismes enzymatiques dont la superoxyde dismutase et la catalase, ainsi que des mécanismes non enzymatiques tels que le glutathion. Ces derniers servent à neutraliser les radicaux libres cellulaires produits dans des conditions physiologiques. Cependant, lorsque le stress oxydatif devient trop important, comme c'est le cas dans certaines conditions pathologiques, ces systèmes deviennent rapidement saturés et n'arrivent plus à compenser la surproduction de radicaux libres. C'est là qu'interviennent les antioxydants exogènes tels que l'acide ascorbique (vitamine C), le lycopène, le β -carotène (vitamine A) et l' α -tocophérol (vitamine E). Dans la majorité des cas, l' α -tocophérol représente la dernière ligne de défense contre le stress oxydatif touchant les membranes lipidiques⁽²⁸⁾.

1.2.2. LA FIBROSE HÉPATIQUE

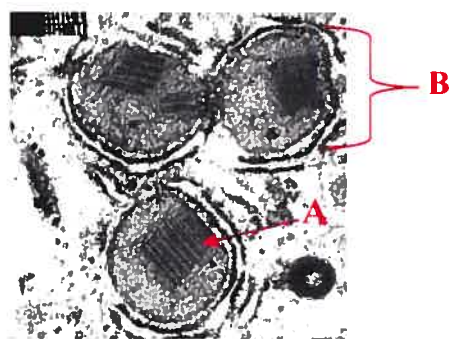
La fibrose hépatique est le résultat de l'activation des cellules de Kupffer et des cellules stellaires hépatiques. Les cellules de Kupffer activées produisent le TGF- β qui, à son tour, active les cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes produisant du collagène⁽²⁹⁾. Plusieurs données suggèrent que le stress oxydatif et la peroxydation des lipides jouent un rôle important dans l'initiation et la progression de la fibrose⁽³⁰⁾. En effet, les produits de la peroxydation des lipides pourraient participer à la fibrogénèse en stimulant la production de TGF- β par les cellules de Kupffer et en stimulant la production excessive de collagène par les cellules stellaires activées⁽³¹⁾. De plus, une étude a démontré

qu'une supplémentation en vitamine E inhibe la fibrogénèse hépatique chez un modèle de NASH chez des souris nourries d'une diète déficiente en méthionine et en choline⁽³²⁾. Par ailleurs, un essai clinique a démontré que la vitamine E réduisait les niveaux plasmatiques de TGF- β ainsi que la fibrose hépatique chez des patients souffrant du NASH⁽³³⁾. Finalement, Ikejima et collaborateurs ont démontré, chez un modèle animal, que la leptine produite par les cellules stellaires activées favorise la fibrose hépatique et pourrait contribuer à la progression de la stéatose vers le NASH et la cirrhose⁽³⁴⁾. Le rôle de la leptine dans la fibrogénèse pourrait donc expliquer en partie l'association entre le degré d'obésité et le risque de fibrose dans le NASH.

1.2.3. LE RÔLE DE LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE DANS LA PATHOLOGIE DU NASH

Plusieurs études ont rapporté des anomalies ultra-structurales des mitochondries hépatiques, incluant des inclusions para-cristallines et des méga-mitochondries, chez les patients souffrant du NASH (voir *Figure 5*). De plus, on observe chez ces patients une diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales et de la synthèse d'ATP, ce qui suggérerait d'importants dommages mitochondriaux dans les hépatocytes de ces patients⁽³⁵⁾.

Figure 5 : Photographie en microscopie électronique des inclusions para-cristallines (Flèche A) à l'intérieur des méga-mitochondries hépatiques (lettre B) chez un patient souffrant du NASH.



Tiré avec la permission de : Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120(5):1183-92.

L'activité mitochondriale représente une source importante de radicaux libres. Plusieurs études ont démontré que les dommages reliés à la chaîne respiratoire mitochondriale sont les causes majeures de la surproduction de radicaux libres⁽³⁵⁾. Parmi les mécanismes possibles qui pourraient contribuer à la dysfonction mitochondriale dans les conditions de stéatohépatite, on retrouve le découplage de la respiration mitochondriale par les AGL et par les produits de la peroxydation lipidique ou le TNF- α ⁽³⁶⁾. Ce découplage provoque la dissipation du potentiel électrochimique de la membrane interne mitochondriale et la diminution de la production d'ATP par cette organelle⁽³⁶⁾. Les dommages mitochondriaux pourraient donc contribuer à l'épuisement des réserves d'ATP et à l'augmentation du stress oxydatif conduisant ainsi à la mort cellulaire et à l'apparition des lésions de stéatohépatite.

1.3. APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DU NASH

La recherche clinique pour évaluer divers traitements potentiels pour le NASH a subi une croissance exponentielle ces dernières années, avec une moyenne de six études publiées par mois depuis les trois dernières années. Malgré cela, il n'existe jusqu'à présent aucun traitement dont l'efficacité a été confirmée par un essai clinique contrôlé, randomisé et faisant preuve d'un échantillonnage suffisant et des paramètres histologiques adéquats.

Le mécanisme pathogénique du NASH suggère une variété de stratégies thérapeutiques potentielles. La majorité de ces approches se retrouvent dans deux catégories; celles qui visent à modifier les habitudes de vie et celles qui demandent l'administration d'agents antioxydants, hypolipidémians, hépatoprotecteurs ou sensibilisateurs à l'insuline (voir *Tableau 1*).

Tableau 1 : Résumé des études publiées pour le traitement du NASH.

Table 6. Reported Therapy for NASH

Reference	Therapy	N	Study Type	Duration	Liver Enzyme Level	Histology
Diet						
Drenick, ¹⁵² 1970	Fasting	11	Open label	1.5-3.5 mo	Not performed	Variable
Drenick, 1970	Diet	7	Open label	2-7 mo	Not performed	Variable
Eriksson, ¹⁴⁷ 1986	Diet	3	Case series	12 mo	Improved	Improved (S,F,I)*
Andersen, ¹⁵³ 1991	Diet	41	Open label	4-23 mo	Improved	Variable
Rozental, ¹⁵¹ 1967	Severe diet	5	Open label	1-4 wk	No change	Variable
Diet, exercise						
Ueno, ¹⁴⁸ 1997	Diet, exercise	25	Open label	3 mo	Improved	Improved (S,F)*
Keeffe, ¹⁴⁹ 1987	Diet, exercise	1	Case series	4 mo	Improved	Improved (S,I)*
Palmer, ¹⁵⁰ 1990	Diet, exercise	39	Case series	2-111 mo	Improved	Not performed
Franzese, ²³⁵ 1997	Diet, exercise	58 (ped)	Open label	6 mo	Improved	Not performed
Vajro, ¹⁵⁴ 1994	Diet, exercise	9 (ped)	Case series	30 mo	Improved	Improved (S,I)*
Saksena, ¹⁴⁰ 1999	Diet, exercise					
Weight loss agents						
Harrison, ¹⁶⁴ 2002	Orlistat	10	Open label	6 mo	Improved	Improved (S,I,F)*
Surgical						
Luyclo, ¹⁶⁶ 1998	Gastroplasty	505	Open label	24 mo	Improved	Improved (S,I)*
Silverman, ¹⁶⁷ 1995	Gastric bypass	91	Case series	2-61 mo	Improved	Improved (S,F)*
Cytoprotective agents						
Oblinata, ²³⁶ 1996	Taurine (diet)	10 (ped)	Open label	6-17 mo	Improved	Not performed
Laurin, ¹⁷⁰ 1996	UDCA	24	Open label	12 mo	Improved	Improved (S)*
Guma, ¹⁷¹ 1997	UDCA (diet)	24	Randomized, open	6 mo	Improved	Not performed
Ceriani, ¹⁷² 1998	UDCA	31	Open label	6 mo	Improved	Not performed
Antioxidants						
Fu, ¹⁸⁴ 1998	LAB	4	Open label	12 wk	Improved	Variable
Lavine, ¹⁷⁶ 2000	Vitamin E	11 (ped)	Open label	4-10 mo	Improved	Not performed
Gulbahar, ¹⁸¹ 2000	NAC	11	Open label	3 mo	Improved	Not performed
Abdelmalek, ¹⁸⁰ 2001	Betaine	8	Open label	12 mo	Improved	Improved (S,F,I)*
Antihyperlipidemics						
Laurin, ¹⁷⁰ 1996	Clofibrate	16	Open label	12 mo	No change	No change
Basaranoglu, ²¹⁰ 1999	Gemfibrozil	46	Randomized, open label	1 mo	Improved	Not performed
Salbara, ²⁰⁹ 1999	Bezafibrate	2	Open label	Not reported	Not reported	Improved (S)*
Horlander, ²¹¹ 2001	Atorvastatin	7	Open label	21 mo	Improved	Improved (S,F,I)*
Nair, ²¹² 2002	HMG-CoA RI	13	Case control	≥6 mo	Not reported	No change
Antidiabetics						
Coyle, ²⁰² 1999	Metformin	2	Open label	4-11 mo	Improved	Improved*
Caldwell, ¹⁸⁹ 2001	Troglitazone	10	Open label	4-6 mo	Improved	Improved (I)*
Marchesini, ²⁰⁴ 2001	Metformin		Open label		Improved	Not performed
Acosta, ¹⁹⁰ 2001	Pioglitazone	8	Case series	2-12 mo	Improved	Improved*
Neuschwander-Tetri, ¹⁹¹ 2002	Rosiglitazone	30	Open label	48 wk	Improved	Improved (I,F)*
Azuma, ¹⁹³ 2002	Pioglitazone	7	Open label	3 mo	Improved	Not performed
Combination						
Mendez-Sanchez, ¹⁷³ 2002	Diet vs. diet + ucda	23	Blind, randomized, controlled	6 wk	Improved equally in both groups	Not reported
Sanyal, ¹⁹⁴ 2002	Vitamin E vs. vitamin E + pioglitazone	21	Randomized, controlled	6 mo	Not reported	Pioglitazone group improved (S,I,B,M)

Légende: *Les paramètres histologiques primaires évalués sont: I, inflammation; S, stéatose; B, cellules balonnées; F, fibrose; M, corps de Mallory.

Tiré avec la permission de: Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37(5):1202-19.

1.3.1. TRAITEMENTS NON PHARMACOLOGIQUES:

1.3.1.1. LA PERTE DE POIDS ET L'EXERCICE PHYSIQUE:

La perte de poids et l'exercice physique améliorent la sensibilité à l'insuline et pourraient être associés à une amélioration du NASH^(37,38). Lors d'une étude clinique, l'adhésion à un régime faible en calories accompagné d'exercice physique a résulté en une amélioration histologique et biochimique du NASH⁽³⁹⁾. Cependant, la perte rapide de poids doit être évitée puisqu'une lipolyse trop accentuée résulterait en une augmentation de la capture des acides gras libres par le foie ce qui pourrait contribuer à aggraver la maladie.

1.3.2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES :

1.3.2.1. LES ANTIOXYDANTS :

Le stress oxydatif représente un candidat de prédilection dans le développement des lésions de stéatohépatite dans le NASH. Ainsi, les agents qui réduisent le stress oxydatif en neutralisant les radicaux libres avant que ces derniers ne causent de dommages au niveau mitochondrial et cellulaire représentent des agents très prometteurs pour le traitement du NASH. Une étude évaluant l'effet d'une thérapie combinant différents antioxydants, incluant la lécithine et les vitamines A, B, C et E ainsi que du sélénium chez quatre patients traités pendant 12 semaines, a démontré une amélioration de la biochimie hépatique et une réduction de la stéatose chez deux patients sur quatre⁽⁴⁰⁾.

L' α -tocopherol est un puissant agent antioxydant liposoluble qui neutralise les radicaux libres dans les membranes biologiques. Lors d'une étude clinique ouverte, 11 enfants obèses avec un indice de masse corporelle supérieur à 32 kg/m² ayant reçu de la vitamine E à des doses variant entre 400 et 1200 UI par jour, ont subi une amélioration de leur biochimie hépatique⁽⁴¹⁾. De plus, une étude japonaise a démontré que l'administration de vitamine E pouvait réduire les niveaux plasmatiques d'alanine aminotransférase (ALT) et de la cytokine pro-fibrogénique TGF- β 1, chez 8 patients adultes souffrant du NASH⁽⁴²⁾. En 2003, Harrison et collaborateurs ont démontré qu'un traitement combinant la vitamine E et la vitamine C pendant 6 mois améliore significativement la fibrose hépatique chez des patients souffrant du NASH⁽⁴³⁾. La base biochimique de ce concept réside dans le fait que la vitamine C pourrait favoriser la régénération de la vitamine E, prolongeant ainsi son effet

antioxydant. Cependant, d'autres études mieux contrôlées et faisant preuve d'un meilleur échantillonnage devront être menées afin de confirmer l'efficacité de la vitamine E en tant que traitement pour le NASH.

Récemment, l'observation que plusieurs patients souffrant du NASH présentaient des niveaux élevés d'homocystéine, a mené à l'hypothèse que la bétaine, médicament utilisé pour le traitement de l'homocystéinurie, pourrait s'avérer efficace comme traitement du NASH. La bétaine est un donneur de groupement méthyle qui joue un rôle important dans la formation de la phosphatidylcholine, une composante importante des VLDL. Ces derniers jouent un rôle prépondérant dans l'exportation des lipides à partir des hépatocytes⁽⁴⁴⁾. Ainsi, un apport supplémentaire en bétaine améliorerait l'extrusion des lipides hors du foie et réduirait donc la stéatose. Dans une étude, parmi 10 patients souffrant du NASH, 7 se sont vus administrés 20 g de bétaine par jour durant 1 an. Une amélioration significative des niveaux sériques de transaminases, du degré de stéatose, de nécro-inflammation et de fibrose a été notée⁽⁴⁴⁾. De ce fait, la bétaine représente un agent prometteur pour le traitement du NASH et devra être évaluée dans des essais cliniques plus adéquats.

Le S-adenosylméthionine (SAMe), qui est la forme active de la méthionine, ainsi que la N-acétylcystéine, qui est métabolisée en glutathion sont reconnus pour leur effet antioxydant au niveau du foie et pourraient donc représenter des thérapies potentielles à évaluer dans des études cliniques.

1.3.2.2. AGENTS CYTOPROTECTEURS

Les sels biliaires sont des détergents qui solubilisent les lipides dans la bile et dans le tube digestif. En règle générale, l'effet détersif et cytotoxique des différents sels biliaires augmente selon leur hydrophobicité relative. L'acide ursodéoxycholique (UDCA) est un sel biliaire hydrophile qui a démontré son efficacité et son innocuité dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive et pour la dissolution des calculs biliaires⁽⁴⁵⁾. L'UDCA est un sel biliaire qui se retrouve naturellement dans la bile, où il joue un rôle dans le contrôle de la concentration de cholestérol dans le sang. En plus de son effet anticholélithique, l'UDCA

posséderait un effet hépatoprotecteur, cytoprotecteur, chimioprotecteur et immunomodulateur. Les travaux de Bolta sur l'UDCA démontrent que celui-ci inhibe le pore de transition mitochondrial qui pourrait être responsable de la mort cellulaire⁽⁴⁶⁾, suggérant ainsi un mécanisme pour expliquer l'effet cytoprotecteur de ce composé.

Une étude a démontré que l'administration d'UDCA à un modèle de NASH chez le rat prévient la stéatose hépatique d'une manière significative⁽⁴⁷⁾. Lors d'une étude pilote chez les patients souffrant du NASH, l'utilisation de l'UDCA a mené à des améliorations de la biochimie et de la stéatose hépatique⁽⁴⁸⁾. Une autre étude chez 31 patients qui ont reçu l'UDCA à une dose de 10 mg/Kg/jour pendant 6 à 12 mois ou une diète faible en lipides a démontré que l'amélioration de la biochimie hépatique est plus fréquente dans le groupe UDCA que dans le groupe diète⁽⁴⁹⁾. Plus récemment, une étude clinique à long terme, randomisée et contrôlée n'est pas parvenue à confirmer l'effet bénéfique de l'UDCA à une dose entre 13 et 15 mg/Kg/jour par rapport au groupe placebo⁽⁵⁰⁾.

Le NCX-1000 est un dérivé de l'UDCA qui libère du monoxyde d'azote au niveau des hépatocytes chez des modèles de rats et de souris. La molécule de NO est reliée à l'UDCA via une molécule d'acide ferrulique. Dans des modèles animaux, cette liaison est rompue par les estérases cellulaires afin de libérer le NO dans le foie. Le NCX-1000 posséderait des effets immunomodulateurs, cytoprotecteurs et anti-apoptotiques^(51,52) et pourrait donc s'avérer efficace dans la prévention ou le traitement du NASH.

1.3.2.3. LES AGENTS ANTIDIABÉTIQUES ET INSULINO-SENSIBILISATEURS

L'association frappante entre le NASH, le diabète et l'IR a mené à l'étude de plusieurs médicaments antidiabétiques pour le traitement du NASH.

La metformine est un traitement efficace de l'hyperglycémie à jeun chez les patients diabétiques de type II⁽⁵³⁾. Elle agit en réduisant la libération de glucose hépatique via l'inhibition de la néoglucogenèse. La metformine a fait l'objet d'une étude pilote qui a démontré une normalisation de la biochimie hépatique ainsi que de l'histologie hépatique chez trois patients atteints du NASH, à la suite d'une année de traitement⁽⁵⁴⁾. Des résultats

aussi encourageants ont été observés lors d'une autre étude sur 20 patients avec le NASH mais non diabétiques, qui ont eu une amélioration de la biochimie et du volume hépatique, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline⁽⁵⁴⁾. Cependant, la metformine ne peut être recommandée pour le traitement du NASH avant que son investigation dans des essais cliniques randomisés et contrôlés ne soit complétée.

Les thiazolidinediones, incluant la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone, améliorent la sensibilité à l'insuline en activant les récepteurs nucléaires PPAR γ . Ces agents améliorent la capture du glucose par les muscles squelettiques, réduisent l'adiposité abdominale, favorisent la différenciation des adipocytes et altèrent la masse mitochondriale⁽¹²⁾. Ainsi, cette classe de médicament pourrait contrer la stéatose causée par une insensibilité hépatique à l'insuline. Dans un modèle de NASH chez des rats nourris avec une diète déficiente en choline, l'administration de pioglitazone a induit une amélioration notable de la stéatose, de la fibrose et des paramètres biochimiques de la stéatohépatite après deux semaines de traitement⁽⁵⁵⁾. Le potentiel thérapeutique de la troglitazone a aussi été étudié chez six patients obèses et non diabétiques. Quatre de ces six patients ont montré une amélioration de la biochimie hépatique⁽⁵⁶⁾. Cependant, à cause de l'hépatotoxicité potentielle de la troglitazone, ce médicament a été retiré du marché. Récemment, une autre étude pilote a été conduite avec la rosiglitazone à une dose de 4 mg, deux fois par jour pendant 48 mois sur 30 patients atteint du NASH. Cette étude s'est conclue en une amélioration de la stéatose hépatique, de la sensibilité à l'insuline et des paramètres biochimiques hépatiques⁽²⁶⁾. Cependant, malgré ces résultats prometteurs, il reste encore place à l'étude des autres agents antidiabétiques dans le traitement du NASH.

1.4. LES MODÈLES ANIMAUX DE LA STÉATOHÉPATITE NON ALCOOLIQUE

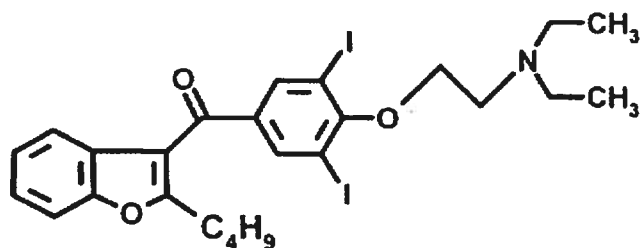
Les modèles animaux du NASH ont énormément contribué à une meilleure connaissance de la pathogenèse de cette maladie. En fait, ce sont ces modèles animaux qui ont fourni les bases conceptuelles de la recherche clinique dans ce domaine.

1.4.1. MODÈLE DE TOXICITÉ DE L'AMIODARONE

En s'inspirant du fait qu'une proportion des patients souffrant d'arythmies cardiaques traitées avec de l'amiodarone présentent des caractéristiques histologiques du foie et sérologiques identiques à celles observées chez les patients souffrant du NASH, Dominique Pessayre et ses collaborateurs ont développé un modèle animal présentant un syndrome semblable au NASH chez la souris^(57,58). Ce modèle animal s'est avéré très instructif en ce qui concerne le rôle important que joue la mitochondrie dans le développement et la progression des lésions de stéatohépatite.

L'amiodarone est un agent antiarythmique de classe III très efficace pour le traitement des tachycardies supraventriculaires et ventriculaires. L'amiodarone est une molécule amphiphile possédant une partie lipophile diiodobenzofurane et une partie partiellement protonée diéthylaminoethoxy (voir *Figure 6*).

Figure 6 : Structure moléculaire de l'amiodarone



Amiodarone

Ce médicament prolonge la durée du potentiel d'action cardiaque en bloquant le récepteur β -adrénergique, les canaux sodiques et les canaux calciques de type L. Cependant, l'utilisation chronique de l'amiodarone est associée à une variété d'effets secondaires tels que des atteintes thyroïdiennes, pulmonaires, rénales et hépatiques. Une légère dysfonction hépatique se produit chez plus de 23 % des patients prenant ce médicament, tandis que l'incidence de lésions hépatiques sévères se situe entre 0.5 et 3 %⁽⁵⁹⁾. Ces lésions incluent la stéatose microvésiculaire, la présence de corps de Mallory, l'infiltration inflammatoire, la fibrose, et parfois même la cirrhose hépatique. Ces lésions

ont été observées tant chez les humains que chez les animaux et sont associés à la stéatohépatite.

Selon les travaux de Fromenty et ses collaborateurs, l'amiodarone et son principal métabolite actif, le N-desethylamiodarone, se concentrent au niveau de la mitochondrie et inhibent la β -oxydation mitochondriale des acides gras ainsi que la chaîne respiratoire mitochondriale et ce, tant dans des modèles *in-vitro* que *in-vivo*. Ainsi, l'inhibition de l'oxydation mitochondriale des acides gras mène à une augmentation de leur estérification en triglycérides et leur dépôt dans les hépatocytes sous forme de petites vésicules lipidiques^(58,60). Par ce fait même, l'administration de l'amiodarone chez des souris provoque une augmentation des triglycérides hépatiques et produit une stéatose microvésiculaire du foie. Ce phénomène représente la stéatose dans l'hypothèse des deux attaques de la pathogenèse du NASH.

De plus, l'amiodarone bloque le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, causant ainsi une augmentation des intermédiaires réduits et l'augmentation du transfert de leurs électrons à l'oxygène pour former le radical superoxyde ainsi que d'autres radicaux libres de l'oxygène⁽⁶⁰⁾. Ces derniers causent la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN cellulaire. L'inhibition de la respiration mitochondriale réduit aussi les niveaux d'adénosine tri-phosphate (ATP) cellulaires. Ainsi, l'épuisement des réserves d'ATP combiné à la peroxydation lipidique pourraient causer la mort cellulaire par nécrose et produire des lésions de stéatohépatite⁽⁵⁸⁾. De ce fait, le modèle de toxicité de l'amiodarone mime bien la pathologie du NASH du point de vue des caractéristiques histologiques et pathophysiologiques.

Ces observations ont conduit au développement d'un modèle animal de stéatohépatite représentatif du NASH chez la souris. Les avantages de ce modèle sont considérables. Premièrement, suite à l'administration intra-péritonéale d'amiodarone à la dose de 150 mg/Kg chez une souris normale, on peut observer de la stéatose en moins de 24 heures et des lésions de stéatohépatite et de la fibrose en quelques jours seulement, contrairement aux autres modèles qui requièrent de longues périodes de temps pour

présenter ce type de lésions. En second lieu, le fait que ce modèle nécessite des souris normales le rend très accessible. Finalement, la toxicité de l'amiodarone est l'un des seuls modèles expérimentaux permettant de faire une transposition vers des études *in vitro* sur des cultures cellulaires afin de mieux étudier les mécanismes sous-jacents au développement du NASH et surtout de cribler plus rapidement un grand nombre de molécules afin d'en évaluer l'efficacité dans ce contexte. Ce sont tous ces éléments qui ont motivé le choix de ce modèle pour effectuer l'étude présentée dans ce mémoire.

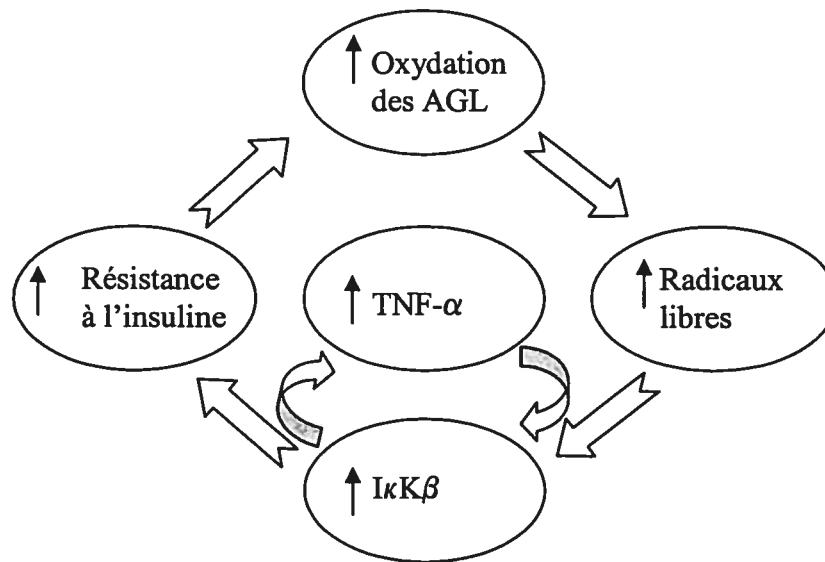
1.4.2. SOURIS GÉNÉTIQUEMENT OBÈSES (Ob/Ob)

Les souris Ob/Ob sont déficientes en leptine à cause d'une mutation du gène Ob, qui code pour la leptine, ce qui en prévient la synthèse. La leptine est l'hormone de la satiété qui est synthétisée par les tissus adipeux blancs. Elle a pour fonction d'inhiber la prise alimentaire et d'augmenter la dépense énergétique. Ainsi, en absence de leptine, les souris Ob/Ob deviennent hyperphagiques, inactives, et par conséquent, obèses⁽⁶¹⁾. Ces souris sont aussi résistantes à l'insuline, hyperinsulinémiques, hyperglycémiques et hyperlipidémiques. Cependant, l'intérêt de ces souris dans ce contexte est qu'elles développent spontanément la stéatose hépatique qui se transforme progressivement en stéatohépatite.

Ce modèle animal est celui qui a contribué le plus à la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement du NASH. C'est en se basant sur ce modèle que Day et ses collaborateurs ont proposé l'hypothèse des deux attaques. En effet, ils ont réussi à démontrer que les attaques subséquentes à la stéatose amplifient la production hépatique de stress oxydatif qui induit la production de cytokines telles que le TNF- α ⁽¹¹⁾. De plus, des études récentes ont démontré le lien entre le stress oxydatif, le TNF- α et la résistance à l'insuline (voir *Figure 7*) en utilisant des agents pharmacologiques et des manipulations génétiques qui inhibent l'activité de la kinase inhibitrice kappa beta ($I\kappa K\beta$)⁽⁶¹⁾. Cette enzyme est activée par le TNF- α ainsi que par le stress oxydatif, pour stimuler à son tour le facteur nucléaire kappa beta (NF- κB), un facteur de transcription induisant la synthèse de TNF- α . Ainsi, le cycle $I\kappa K\beta$ /TNF- α devient auto-stimulé et induit une résistance à l'insuline perpétuelle et un état inflammatoire chronique. De ce fait,

l'inhibition de l'enzyme $I\kappa K\beta$ renverse la résistance à l'insuline de ces souris ainsi que l'inflammation et les lésions hépatocytaires.

Figure 7 : Diagramme schématisant le lien entre le stress oxydatif, la résistance à l'insuline et le $TNF-\alpha$.



1.4.3. LE MODÈLE DES SOURIS NOURRIES AVEC UNE DIÈTE DÉFICIENTE EN CHOLINE ET EN MÉTHIONINE

Une diète déficiente en choline et en méthionine cause l'épuisement des réserves hépatiques d'antioxydants, dont le glutathion réduit et la S-adenosylméthionine chez les souris ou les rats. Cette diète induit aussi la synthèse de $TNF-\alpha$ ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires. Le stress oxydatif accru et le $TNF-\alpha$ activent la voie de la $I\kappa K\beta$, menant à l'insulinorésistance, aux surcharges hépatiques en graisses et éventuellement à des lésions de stéatohépatite⁽⁶¹⁾. Ce modèle animal s'est avéré très utile pour démontrer l'importance du stress oxydatif dans la pathogénèse de ces lésions.

1.5. BUT DE L'ÉTUDE

Depuis sa première description par Ludwig et ses collaborateurs⁽⁶⁾, beaucoup d'éléments ont été découverts sur les causes, la pathogenèse et les conséquences de la stéatohépatite non alcoolique. Bien qu'elle demeure généralement une maladie bénigne avec peu de symptômes et de séquelles cliniques pour la majorité des patients, le NASH peut évoluer vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique nécessitant une greffe du foie⁽¹³⁾. De plus, le NASH représente la maladie chronique du foie la plus répandue dans les pays occidentaux.

On comprend encore mal la pathogenèse du NASH et malgré le nombre important d'études cliniques et fondamentales qui y ont été consacrées, il n'existe encore aucun traitement qui a prouvé son efficacité lors d'essais cliniques randomisés et contrôlés.

Plusieurs modèles animaux ont été développés dans le but de mieux caractériser et de mieux comprendre la pathologie du NASH. Dans la présente étude, un modèle *in-vitro* a été développé afin de mimer les dommages hépatocytaires observés lors du NASH en traitant les hépatocytes de souris en culture avec de l'amiodarone.

Ainsi, l'un des buts de ce projet était de tenter de mieux définir certains mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition des lésions hépatocytaires reliées à la stéatohépatite. On a d'abord évalué l'implication de chacun des types de mort cellulaire, en l'occurrence la nécrose et l'apoptose, dans la cytotoxicité causée par l'amiodarone. Par la suite, il a été question de mettre en évidence le rôle du stress oxydatif dans le développement des lésions cellulaires entraînées par l'amiodarone. À ce niveau, deux paramètres ont été pris en compte, le premier étant la production de radicaux libres par les cellules et le second étant la peroxydation des lipides. À ce niveau, notre principale hypothèse était que l'amiodarone causerait la mort cellulaire en partie via un stress oxydatif.

Une fois le modèle *in vitro* bien établi et les effets de l'amiodarone sur les hépatocytes en culture caractérisés, on a évalué le potentiel protecteur de plusieurs composés chimiques potentiellement bénéfiques dans la prévention des lésions provoquées par l'amiodarone. Parmi les composés à l'étude, on retrouve l'acide ursodéoxycholique (UDCA) et son dérivé le NCX-1000, qui semblent posséder des effets cytoprotecteurs et par conséquent, qui pourraient améliorer la viabilité des hépatocytes en culture en présence d'amiodarone. De plus, puisque le stress oxydatif s'est avéré grandement impliqué tant dans notre modèle que dans le NASH, on a évalué l'effet de certains agents antioxydants de différentes natures dont la vitamine E, la vitamine C et le butylhydroxytoluène, et de leur combinaison avec des agents cytoprotecteurs dans la prévention du stress oxydatif et de la cytotoxicité de l'amiodarone

En conclusion, cette étude pourrait fournir un rationnel thérapeutique intéressant pour de futures études cliniques afin de développer un traitement efficace pour la stéatohépatite non alcoolique.

Le manuscrit présenté au prochain chapitre a été présenté à la revue scientifique *Gastroenterology*. L'ensemble des manipulations ont été réalisées par l'auteur de ce mémoire avec l'aide d'Allal Chabli et d'Antoine Brault.

List of abbreviations

AMD: Amiodarone

BHT: Butylated hydroxytoluene

NASH: Non alcoholic steatohepatitis

HO: Hoechst 33342

LCL: Lucigenin enhanced chemiluminescence

MDA: Malondialdehyde

NO: Nitric oxide

PI: Propidium iodide

ROS: Reactive oxygen species

SNP: Sodium nitroprusside

UDCA: Ursodeoxycholic acid

Financial support

This study was supported by a grant from Axcan Pharma Inc.

ABSTRACT

Background & Aims: Non alcoholic steatohepatitis (NASH) is a common and potentially severe form of liver disease. The objective of this study is to determine the effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) and its NO-releasing derivative NCX-1000, alone or in combination with different antioxidants on cultured mouse hepatocytes treated with amiodarone (AMD) to mimic NASH like hepatocyte injury.

Methods: Isolated mouse hepatocytes were incubated with or without UDCA or NCX-1000 (0-100 μ M) associated or not to the hydrophilic antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT, 0-100 μ M) and ascorbic acid (vitamin C, 0-100 μ M) or to the lipophilic antioxidant α -tocopherol (0-100 μ M) 15 min before adding AMD (50 μ M) to the culture medium. Twenty hours later, necrosis, apoptosis, superoxide anion and malondialdehyde levels were assessed in cultured cells.

Results: As expected, amiodarone led to a dose-dependent decrease in cell viability with a LD₅₀ of 50 μ M. Amiodarone also increased superoxide anion and lipid peroxidation levels. NCX-1000 showed a significantly better protective potential than UDCA against the toxic effects of amiodarone. The hydrophilic antioxidants BHT and ascorbic acid had no effect on the toxicity of amiodarone, while α -tocopherol at conc. >100 μ M almost completely suppressed it. UDCA and NCX-1000 protection was additive only when they were associated with small concentrations of α -tocopherol and not with BHT or ascorbic acid. In addition, all the antioxidants tested efficiently scavenged superoxide anion, but only α -tocopherol prevented lipid peroxidation induced by amiodarone.

Conclusion: The association of lipophilic antioxidants with UDCA or NCX-1000 enhances their protective potential and could represent an interesting therapeutic approach for the treatment of NASH.

INTRODUCTION

The recognition of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) as a chronic liver disease has evolved since the original description of the syndrome by Ludwig et al. in 1980⁽¹⁾, but its pathogenesis still remains unclear. Histologically, it is indistinguishable from alcoholic liver disease. Lesions commonly associated with NASH include steatosis, lobular inflammation, typically with small clusters of polymorphonuclear leukocytes, liver cell ballooning, giant mitochondria, perisinusoidal fibrosis, and possibly Mallory's hyaline⁽²⁾. It was originally thought that NASH is mainly encountered in obese, middle-aged women and often associated with diabetes mellitus and hyperlipidemia⁽³⁾. The disease is now known to occur in subjects of all ages and races, both genders, and even in those without obesity or diabetes mellitus. The prevalence of NASH is estimated at 3 to 4% in the Western world⁽⁴⁾. Furthermore, the concept that NASH is relatively benign in nature is now challenged. Indeed, some reports show that NASH can result in the development of fibrous tissue in the liver for up to 40% of patients or cirrhosis in 12% of patients⁽⁵⁾ and that recurrence may occur after liver transplantation^(6,7). The prevalence of NASH is increasing and the disease probably carries a similar risk of progression to cirrhosis as does chronic hepatitis C⁽⁸⁾. Furthermore, many NASH patients are unaware of their condition because they do not exhibit any symptoms.

The histopathologic features of NASH represent a pattern of lesions that may be due to several pathways that culminate in liver injury, regardless of the specific etiology. These include fatty acid accumulation, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. Actually, there is no universally accepted treatment for NASH. Thus, understanding the cellular and molecular mechanisms leading to liver injury in NASH is critical to planning new interventional strategies.

The 'two hit' model of pathogenesis of NASH proposed by Day and James, implicates steatosis as the first hit⁽⁹⁾. Such lipid accumulation increases the sensitivity of the liver to the second hit, which entails an oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS), causing lipid peroxidation leading to cell injury in the fatty liver^(9,10). Lipid peroxidation has been shown to play a role in NASH in studies showing its presence in both

animal models of non-alcoholic fatty liver and humans with steatosis of different etiologies. Steatosis is the initial event in the course of this disease and recently an attractive concept has suggested that the basal cellular ROS formation may be sufficient to oxidize hepatic fat deposits and cause some lipid peroxidation.

In steatosis of different etiologies, the fat is typically microvesicular in distribution and results predominantly from the inhibition of mitochondrial β -oxidation of fatty acids by a variety of different mechanisms⁽¹¹⁾. While many drugs are associated with the development of steatosis, only one class of drugs is commonly associated with classical steatohepatitis, namely the cationic amphiphilic amines: amiodarone, perhexiline, and the coronary vasodilator 4,4'-diethyl-aminoethoxyhexestrol (DEAEH). Prolonged administration of amiodarone, DEAEH, or perhexiline may cause the progressive development of steatohepatic lesions in humans^(11,12,13). It has been shown that amiodarone inhibits mitochondrial β -oxidation thereby leading to lipid deposits in hepatocytes⁽¹⁴⁾. Furthermore, amiodarone increases the formation of ROS by mitochondria and causes lipid peroxidation⁽¹⁴⁾. This supports the notion that lipid peroxidation is an important determinant in the pathogenesis of NASH and implicates mitochondria in this process. The similarity in the histological features of amiodarone-induced hepatitis to those of NASH suggests that common mechanisms of injury could be involved. We thus chose to develop an *in vitro* model of NASH-like mechanisms by treating primary mice hepatocytes with the antiarrhythmic drug amiodarone (AMD).

Ursodeoxycholic acid (UDCA) is a hydrophilic bile salt used to treat cholestatic liver diseases. It initially appeared to be a promising compound that could play a role in the future treatment of NASH. However, recent clinical evidence failed to demonstrate any beneficial effect of UDCA, at a dose between 13 and 15 mg/kg/d for 2 years, above that of a placebo⁽¹⁵⁾. UDCA may have cytoprotective, chemoprotective and immunomodulatory properties that could benefit the liver in the course of NASH^(16,17,18). As ROS are believed to play a major role in the development of NASH, lipophilic antioxidants like α -tocopherol (vitamin E) and hydrophilic antioxidants like ascorbic acid (vitamin C) and butylated hydroxytoluene, which are powerful scavengers of free radicals, may also have a beneficial

effect in the treatment of NASH. NCX-1000 is a nitric oxide (NO) releasing derivative of UDCA that has been shown to exert immunomodulatory, cytoprotective and anti-apoptotic effects in an animal model of liver injury⁽¹⁹⁾.

The objective of this study was thus to investigate the effect of the UDCA and NCX-1000 alone or in combination with antioxidants in an *in vitro* model of hepatocytes treated with amiodarone.

EXPERIMENTAL PROCEDURES:

Materials Hoechst 33342 (HO) and Propidium Iodide (PI) were purchased from Molecular Probes Inc. (Eugene, Or), Williams' E and Leibovitz 15 (L-15) media, lucigenin, α -tocopherol, ascorbic acid, butylated hydroxytoluene, thiobarbituric acid, sodium tungstate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, sodium nitroprusside and amiodarone (AMD) were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario). Collagenase type 1 was purchased from Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ). Axcan Pharma (Mont St-Hilaire, Canada) graciously provided ursodeoxycholic acid (UDCA) and NCX-1000. Fetal bovine serum (FCS) was purchased from Gibco (Burlington, Ontario).

Isolation and culture of mouse hepatocytes Male Balb-c mice (45 – 55 days) were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec). Hepatocytes were isolated from mouse livers by a two step collagenase perfusion method. Briefly, mice were anaesthetized with pentobarbital (1,6 ml/Kg, MTC pharmaceuticals, Cambridge, Ontario) and the portal vein was cannulated. The liver was perfused four minutes with nominally calcium-free Hepes buffer and seven minutes with CaCl_2 (1 g/L) enriched Hepes buffer containing collagenase (0,5 g/L). After this digestion, the liver was placed in L-15 medium. The hepatocytes were suspended and filtered through a nylon mesh, washed three times with L-15 medium and resuspended in 10 ml of Williams' E medium. Cell count and viability were assessed with a haemocytometer and by Trypan blue exclusion, respectively. Experimental protocols were approved by the University of Montreal Animal Experimentation Ethics Committee and mice were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Hepatocytes were seeded at a density of 25 000 cells/cm² in warm Williams' E medium supplemented with 5% fetal bovine serum in 35 mm Petri dishes for the fluorescent nuclear staining assay or in 150 mm Petri dishes for the chemiluminescence assay (see below). Cells were allowed to adhere for 2 hours. The culture medium was then replaced with a fresh solution supplemented with UDCA or NCX-1000 (in DMSO) associated or not with α -tocopherol (in ethanol), vitamin C or BHT, fifteen minutes before adding AMD (in DMSO). The dishes were incubated for 20 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air/5% CO₂. Solvent controls were included and DMSO or ethanol concentrations never exceeded 0,1%.

Nuclear staining with Hoechst 33342 and propidium iodide The nuclear probe propidium iodide (PI) was used to distinguish necrotic cells from living or apoptotic ones. Apoptotic cells were stained with HO. Cell viability was represented by the ratio of living cells to the total number of cells (living, necrotic and apoptotic). Cells in culture in 35 mm Petri dishes were double stained with HO and PI using a 20-minute incubation at 37°C. Cells were assessed on an inverted microscope (Nikon Eclipse TE-200) and counted manually under fluorescent light using a NARUV cube for the HO blue fluorescence and a HQ R/D11 cube for the red coloration of PI.

Oil Red-O staining to assess the neutral lipids content of the hepatocytes Cells in culture were stained with a solution of Oil Red-O in 2-propanol for 5 min at room temperature. Afterwards, the cells were washed three times with PBS and assessed on an inverted phase contrast microscope to distinguish the red colour of the lipid-containing vesicles. Photographs were taken with an Olympus OM20 camera.

Chemiluminescent measurement of the superoxide anion production. Cells were washed with Krebs-Hepes buffer three times, suspended, centrifuged and counted with a haemocytometer. Approximately 1×10^6 cells were transferred to a 5 mL glass vial containing 1.8 ml of Krebs respiration buffer. LCL response was initiated by adding lucigenin to obtain a final concentration of 25 μ M in the vial. LCL was monitored with a Wallac 1400 rackbeta liquid scintillation counter at room temperature. The luminescence was measured for 60 seconds 15 times and results are shown in counts per minute.

High-performance liquid chromatographic detection of malondialdehyde Malondialdehyde (MDA) is considered to be a biomarker for lipid peroxidation in live organisms and cultured cells. Cells were washed twice with phosphate buffer 0.1 M, suspended and centrifuged (5 min, 500 RPM, 4°C). The cell pellets were resuspended in 300 μ l of phosphate buffer and sonicated. Proteins were then precipitated with a 10% sodium tungstate (Na_2WO_4) solution. The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution at 90°C for 60 min. The pink chromogene [(TBA)₂-MDA] was extracted twice with n-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a KH_2PO_4 /methanol mobile phase (70:30, pH 6.75) before MDA detection by HPLC. Standard curve was prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane diluted in water as a source of MDA.

Statistical analysis Two sided ANOVA statistical comparisons using the *SigmaStat Software* (Jandel Scientific) was carried out. Data are presented as means \pm SEM for the indicated number of determinations.

RESULTS

Toxic effect of amiodarone on isolated cultured mouse hepatocytes

Isolated mouse hepatocytes put into primary culture were sensitive to the antiarrhythmic drug amiodarone. Indeed, amiodarone treatment for 20 h decreased hepatocyte viability in a dose-dependent manner. Cell death became evident with concentrations of 20 μM and was complete when amiodarone concentrations reached 100 μM (Figure 8A). An LD_{50} value of 50 μM was obtained and this concentration was used for subsequent experiments. A time-course study was also carried out with amiodarone over a period of 20 h and showed that the cytotoxic effect of amiodarone was time-dependent, cell death being evident by 2 h and stabilizing by 12 h. Cell death was due mainly to necrosis. Indeed, HO-33342 stained the nuclei of all cells, but less than 5% exhibited the typical chromatin condensation and nuclear fragmentation of apoptosis. On the other hand, amiodarone treatment induced morphological changes in cultured mouse hepatocytes, which included cell swelling and the accumulation of clear vesicles within the cytoplasm (Figure 8C) as compared to normal control cells (Figure 8B). The lipidic nature of these cytoplasmic droplets was confirmed by Oil Red-O staining (Figure 8D). Amiodarone treatment *in vitro* thus reproduced the steatosis found in the *in vivo* mouse model.

Effect of UDCA, NCX-1000 and antioxidants on amiodarone-treated hepatocytes

When administered to cultured mouse hepatocytes, the bile acid UDCA and its NO-releasing derivative, NCX-1000, exhibited no cytotoxic effect (results not illustrated). On the other hand, increasing concentrations of UDCA significantly diminished amiodarone-induced cell death (Figure 9). Cell viability improved by $12 \pm 3 \%$ at a concentration of 20 μM and the protective effect remained stable at higher concentrations. At concentrations higher than 20 μM , NCX-1000 showed a significantly better protective potential than UDCA, improving cell viability at a greater extent and in a more dose-dependent manner (Figure 9). In fact, pre-treatment of cell cultures with 20 μM or 100 μM of NCX-1000 increased cell viability by $17 \pm 2 \%$ (versus UDCA, $12 \pm 3 \%$, NS) and $33 \pm 5 \%$ (versus UDCA, $17 \pm 5 \%$, $P < 0.05$) respectively. Furthermore, in order to evaluate the specific effect of nitric oxide (NO) in our experimental conditions, we have assessed the efficacy of

the standard NO-donor sodium nitroprusside (SNP), in preventing amiodarone induced cell death. Pre-treatment of cultured hepatocytes with 20 μM of SNP resulted in a 7 ± 2 % increase of cell viability. These results suggest that the enhanced protective potential of NCX-1000 *versus* UDCA is due to the combined protective effect of UDCA and NO. Consequently, we have chosen a concentration of 20 μM of each compound for subsequent experiments.

The lipophilic antioxidant α -tocopherol protected cultured mouse hepatocytes against amiodarone-induced cytotoxicity to an even greater extent than UDCA or NCX-1000. Improvement of hepatocyte viability was evident with 10 μM vitamin E and reached maximal values of 53 ± 2 % at 100 μM (Figure 10). Hence, the effect was dose-dependent and an EC_{50} value of 20 μM was determined. This concentration was used for the subsequent experiments. In addition, vitamin E did not change amiodarone-treated cells morphology. In contrast with UDCA, NCX-1000 or vitamin E, the hydrophilic antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and vitamin C (0 to 100 μM), did not prevent amiodarone-induced cytotoxicity (Figure 10). None of the antioxidants tested had any deleterious effects on primary cultures of mouse hepatocytes when administered alone (results not shown).

We next evaluated the potential benefits of combinations of UDCA or NCX-1000 with antioxidants against amiodarone-induced cytotoxicity. Treatment of mouse hepatocytes with 20 μM each of UDCA and vitamin E yielded a significantly better improvement of cell viability than either compound alone (Figure 11). In fact, the effect was additive; UDCA increased hepatocyte viability by 12 %, vitamin E by 20 % (Figure 11), and the combination of compounds improved it by 30%. The combination of 20 μM of NCX-1000 with 20 μM of vitamin E also led to a better protection for hepatocytes in an additive way. Indeed, 20 μM of NCX-1000 increased cell viability by 17 %, vitamin E by 20 %, and their combination improved cell viability by 38 %. In contrast, the incubation of mouse hepatocytes with 40 μM of BHT or 20 μM of vitamin C did not reduce amiodarone-induced cell death, as mentioned above, and did not improve the protective effect of 20 μM of either UDCA or NCX-1000 (Figure 12, panels A and B respectively).

Assessment of superoxide anion production

Under control conditions, superoxide anion generation in cultured hepatocytes was negligible. Treatment of cultured mouse hepatocytes with 50 μM amiodarone induced a $110 \pm 30\%$ increase of superoxide anion production, as compared to untreated controls (Figure 13). Hence, our *in vitro* model reproduced another component of *in vivo* amiodarone-induced liver damage, namely oxidative stress emanating from mitochondrial ROS overproduction. The treatment of cells with 20 μM UDCA did not affect amiodarone-induced superoxide anion production (Figure 13). Even when UDCA concentrations were increased to 50 or 75 μM , no significant antioxidant potential was observed. In contrast, NCX-1000 reduced by 25 % the levels of superoxide anion produced in amiodarone-treated cells, suggesting a free radical scavenging property for the nitric oxide moiety that has been suggested to be released in hepatocytes during cell culture. Furthermore, when the cells were incubated with any one of the antioxidants tested, ROS overproduction was completely suppressed (Figure 13).

Assessment of MDA concentrations in cultured hepatocytes

Under control cell culture conditions, free MDA concentrations in cultured hepatocytes were negligible (0.007 nmol/mg of protein, Figure 14). As expected from the increased production of the superoxide anion, MDA concentrations increased to 0.10 nmol/mg of protein and 0.21 nmol/mg of protein in cells treated with 50 μM and 100 μM of amiodarone, respectively. These results indicate that amiodarone induces high levels of lipid peroxidation in cultured hepatocytes in a dose-dependant manner.

Pre-treatment of the cells with 20 μM of UDCA before adding amiodarone to the culture medium resulted in similar MDA concentrations as with amiodarone alone (0.11 versus 0.10 nmol/mg of protein, NS), suggesting that UDCA does not exert any antioxidant effect and does not prevent amiodarone induced lipid peroxidation. In contrast, cell cultures pre-treated with 20 μM of NCX-1000 or of the standard NO donor SNP showed a 20 % decrease in the amount of MDA produced as compared to cells treated with amiodarone alone ($p < 0.05$)

Interestingly, among all the antioxidants tested, only α -tocopherol completely prevented the MDA overproduction induced by amiodarone. In cells pre-treated with the hydrophilic antioxidants BHT and vitamin C, MDA concentrations were 0.12 and 0.13 nmol/mg of protein, respectively, and were not significantly different from those resulting from amiodarone treatment alone.

DISCUSSION

Our study shows that the *in vitro* treatment of isolated mouse hepatocytes with amiodarone reduces cell viability in a dose-dependent manner. Death occurs primarily by necrosis, as evidenced by propidium iodide staining and by the lack of morphological changes in chromatin, classically associated with apoptosis. These findings are compatible with the effect of amiodarone to inhibit mitochondrial respiration, causing the depletion of adenosine triphosphate (ATP), which leads to necrotic cell death as opposed to apoptosis⁽¹⁴⁾. These damages are accompanied by the deposition of lipid droplets and by the overproduction of the ROS superoxide anion causing increased lipid peroxidation. Hence, our *in vitro* model accurately reproduces two key features of NASH pathogenesis, namely steatosis and oxidative stress. Indeed, these components represent the basis for the “two-hit” model developed by Day and James⁽¹⁰⁾ to describe the pathogenesis of NASH.

In the two hit model, the first hit is represented by the development of steatosis, most probably due to the known inhibition of mitochondrial β -oxidation by amiodarone⁽¹⁴⁾. Our *in vitro* model of amiodarone treatment appropriately mimicked this first hit as evidenced by the abundant vesicles observed. These were confirmed to contain lipids by Oil Red-O staining. The second hit is thought to originate from an increase in the formation of reactive oxygen species (ROS), mainly due to mitochondrial dysfunction⁽¹³⁾, and leading to higher levels of lipid peroxidation. Here again, our *in-vitro* model of amiodarone toxicity reproduced this second hit, as evidenced by a significant production of O_2^- , an important ROS, and MDA, a key marker of lipid peroxidation .

In our *in vitro* model of amiodarone toxicity, treatment with UDCA partially protected mouse hepatocytes from the deleterious effects of amiodarone. Moreover, control experiments in which hepatocytes were treated with UDCA alone (in the absence of amiodarone) confirmed that the bile acid did not affect hepatocyte cell viability and hence is not cytotoxic. Interestingly, the effect of UDCA did not appear to be mediated by a decrease in the ROS production or the lipid peroxidation caused by amiodarone. This suggests that UDCA may not possess much antioxidant potential.

NCX-1000 is a NO releasing derivative of UDCA. In murine models of liver injury, NCX-1000 has been shown to release its NO moiety specifically in the liver⁽¹⁹⁾. NCX-1000 is now under clinical investigation in order to determine its efficacy in secondary prevention of variceal esophageal bleeding. In the current study, NCX-1000 exerted a protective effect against amiodarone toxicity in a dose-dependent manner and this effect was greater than with UDCA. Furthermore, experiments conducted with the NO donor SNP also showed a protective effect against amiodarone-induced cell death, suggesting that the NO delivered to hepatocytes plays an independent role in reducing the toxic effects of amiodarone in addition to the protective effect of UDCA. Moreover, pre-treatment of cultured cells with NCX-1000 and with SNP, but not with UDCA, resulted in less superoxide anion production and a smaller degree of lipid peroxidation, suggesting a free radical scavenging effect of the NO in our experimental conditions. In fact, previous studies have demonstrated that NO can prevent cell injury by reducing the induction of necrosis and apoptosis⁽²⁴⁾. This NO cytoprotective effect may be due to the stimulation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) formation, s-nitrosylation of degradative enzymes and caspases, reaction with deleterious ROS and effects on mitochondrial respiration⁽²⁴⁾.

Among the other treatments for NASH that have yielded encouraging clinical results is the antioxidant vitamin E. In a study by Lavine et al., 17 obese pediatric patients with abnormal liver enzymes were given vitamin E. All patients achieved normalization of liver enzymes⁽²⁵⁾. Furthermore, Hasegawa et al. observed a reduction of liver enzymes as well as an improvement of histological alterations⁽²⁶⁾. Here, we have demonstrated that the treatment of hepatocytes with vitamin E completely scavenged ROS overproduced by the amiodarone treatment. This resulted in the prevention of lipid peroxidation and a highly efficient protection of hepatocytes against the deleterious effects of amiodarone. Interestingly, the combination of UDCA or NCX-1000 with vitamin E had an additive effect on the reduction of cell necrosis. A similar tendency was observed with ROS production (not illustrated). This suggests that vitamin E and UDCA may act through different mechanisms of action.

We also tested the effects of hydrophilic antioxidants, namely ascorbic acid (vitamin C) and BHT. Ascorbic acid and BHT did not show any toxicity in regards to cell viability. However, increasing doses of BHT or vitamin C (0 to 100 μ M) had no protective effect on amiodarone-induced cell death. Similarly, when administered in combination with UDCA, BHT and vitamin C were without effect. In addition, even though those antioxidants efficiently scavenged superoxide anion production induced by amiodarone, they did not prevent lipid peroxidation in cell cultures, as was the case with vitamin E. This is interesting because vitamin E is a liposoluble antioxidant, in contrast to BHT and vitamin C, which are hydrosoluble. This strongly suggests that the effect of vitamin E is membrane specific, while BHT and vitamin C, being confined to the cytosolic compartment, may be without effect. By virtue of the LCL assay, it is the superoxide anions released by the cells that are measured, and these are efficiently quenched by all antioxidants used. However, quenching of intracellular ROS may be less uniform. Thus, it is possible that the protective effect of vitamin E is mainly due to scavenging the ROS produced near the endoplasmic reticular or mitochondrial membranes, whereas hydrophilic antioxidants BHT and vitamin C could only scavenge ROS present in the cytoplasm.

In summary, the present study demonstrates that isolated mouse hepatocytes treated with amiodarone reproduce several of the key features of NASH. This *in vitro* model can thus be useful to study the cellular and molecular mechanisms of NASH-like injury at the parenchymal cell level. Our results also show that UDCA affords a partial protection to mouse hepatocytes against the deleterious effect of amiodarone. This effect is not associated with a decrease in ROS production induced by the presence of amiodarone. The NO-releasing derivative of UDCA, NCX-1000, affords a better protection for mouse hepatocytes than its precursor and that difference can be attributed to the additional beneficial effect of NO. Treatment with vitamin E adequately prevents lipid peroxidation and is even more effective in protecting hepatocytes exposed to amiodarone than UDCA or NCX-1000. Moreover, the combination of vitamin E with UDCA or NCX-1000 has an additive effect. In contrast, the free radical scavenger effect of hydrophilic antioxidants does not prevent lipid peroxidation and do not protect mouse hepatocytes against amiodarone toxicity. Taken altogether, our data suggest that the deleterious effect of amiodarone on mouse hepatocytes may proceed by at least two mechanisms, one being

ROS dependent (possibly lipid peroxidation targeted by lipophilic, but not hydrophilic, antioxidants) and the other being unrelated to ROS (possibly targeted by UDCA).

REFERENCES

- 1) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experience with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
- 2) Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-9.
- 3) Powell EE, Cooksley WG, Hanson R. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
- 4) Contos MJ, Synyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol* 2002;9:37-51.
- 5) Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997;126:137-45.
- 6) Carson K, Washington MK, Treem WR. Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 1997;3(2):174-6.
- 7) Molloy RM, Komorowski R, Varma RR. Recurrent nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1997;3(2):177-8.
- 8) Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss med wkly* 2002;132:493-505.
- 9) James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol.* 1998;29(3):495-501.
- 10) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
- 11) Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in liver disease* 2001;21:57-69.
- 12) Chitturi S, Farrell GC. Drug-Induced Liver Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2000;3(6):457-462.
- 13) Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N et al. Steatohepatitis-Inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114:764-74.
- 14) Fromenty B, Fisch C, Berson A, Lettéron P, Larrey D, Pessayre D. Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect

- followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:1377-84.
- 15) Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004;39(3):770-8.
 - 16) Stiehl A, Benz C, Sauer P. Mechanism of hepatoprotective action of bile salts in liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:195-209.
 - 17) Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995;72:930-8.
 - 18) Joshi S, Cauch-Dudek K, Wanless IR, Lindor KD, Jorgensen R, Batts K, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2000;35(2):409-13.
 - 19) Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Del Soldato P, Morelli A, Ignarro LJ. An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2652-7.
 - 20) Sorrell MF, Mukherjee S. Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Curr Treat Options Gastroenterol* 1999;2(6):447-50.
 - 21) Laurin J, Lindor K, Crippin J, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, Ramella J, et al. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 1996;23:1464-7.
 - 22) Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Agenda for Clinical Research. *Hepatology* 2002;35(4):746-52.
 - 24) Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2004;39(6):1533-43.
 - 25) Lavine JE. Vitamin E treatment on nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr* 2000;136:734-8.
 - 26) Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-

alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(10):1667-72.

FIGURE LEGENDS

Figure 8 Panel A represents the dose-dependant effect of amiodarone on hepatocyte viability. Hepatocytes were cultured in Williams medium E in presence amiodarone for 20 h at 37⁰C. Viability was assessed with the nuclear probes Hoechst 33342 and propidium iodide by fluorescent microscopy. Values are means±SEM from eight different preparations of mouse livers. Panel B is a micrograph in phase contrast microscopy of hepatocytes cultured in control conditions showing normal cell morphology. Panel C shows the effect of amiodarone on cell morphology, demonstrating swollen hepatocytes, indicative of cell injury, and clear cytoplasmic droplets. Panel D represents the Oil red-O staining of amiodarone treated hepatocytes confirming the lipidic nature of the droplets coloured in red in phase contrast microscopy.

Figure 9 The concentration-dependent effect of UDCA and NCX-1000 on the viability of amiodarone-treated cells. Viability was assessed using Hoechst 33342 and propidium iodide nuclear probes by fluorescent microscopy. Values are means of cell viability±SEM from eight different preparations of mouse livers. * Significantly different from the corresponding concentration of UDCA, p< 0.05.

Figure 10 The concentration dependant effect of vitamin E, BHT and vitamin C on the viability of amiodarone-treated cells. Viability was assessed with Hoechst 33342 and propidium iodide by fluorescent microscopy. Values are means of cell viability±SEM from six different preparations of mouse livers.

Figure 11 The effect of UDCA, NCX-1000, vitamin E, and their combination on the viability of amiodarone-treated cells. The hepatocytes were cultured in Williams medium E in presence of 50 µM amiodarone with or without 20 µM UDCA or 20 µM NCX-1000 associated or not with 20 µM vitamin E for 20 h at 37⁰C. Viability was assessed with Hoechst 33342 and propidium iodide by fluorescent microscopy. Values are means of cell viability+SEM from six different preparations of mouse livers. *Significantly different from control, p<0.05; †Significantly different from UDCA or NCX-1000, p<0.05; ‡ Significantly different from UDCA+Vitamin E, p<0.05.

Figure 12 The effect of BHT and vitamin C alone (A) or in combination with UDCA or NCX-1000 (B) on the viability of amiodarone-treated cells. Hepatocytes were cultured in Williams medium E with 40 μM of BHT or 20 μM vitamin C associated or not with 20 μM UDCA or NCX-1000 in presence of 50 μM amiodarone for 20 h at 37⁰C. Viability was assessed using Hoechst 33342 and Propidium iodide under fluorescent light with an inverted microscope. Values are means of cell viability+SEM from six different preparations of mouse livers

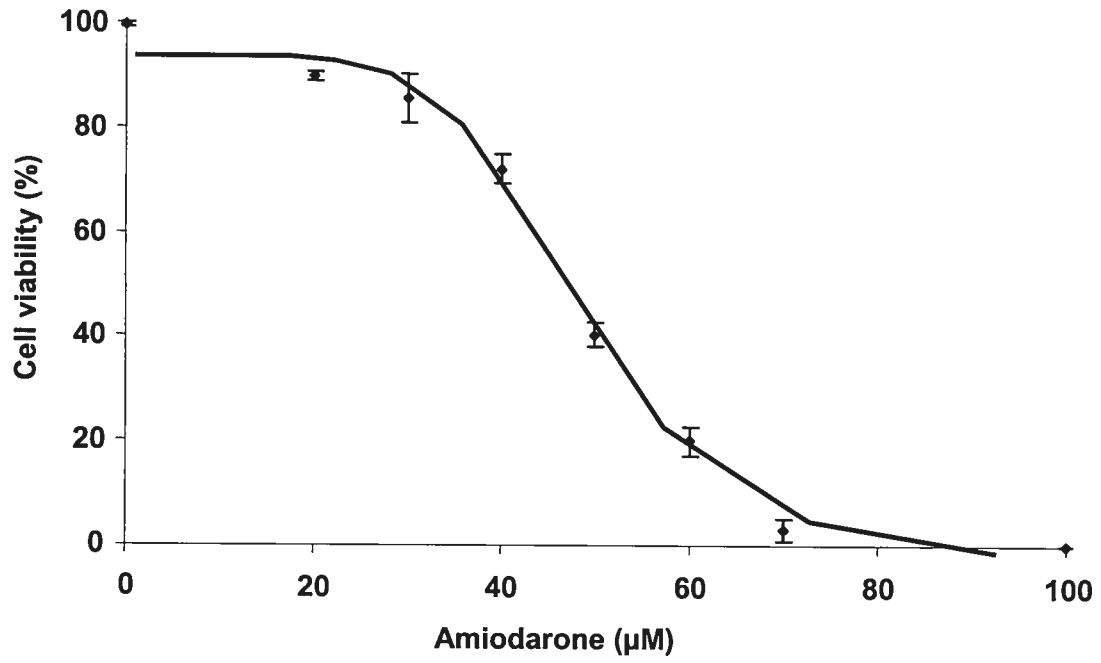
Figure 13 The effect of UDCA, NCX-1000, BHT, vitamin C, and vitamin E on the increase of superoxide anion production induced by amiodarone in isolated hepatocytes. Hepatocytes were incubated in the presence of those compounds plus 50 μM amiodarone for 20 h, then washed and suspended in a respiration buffer. Superoxide anion production was assessed by lucigenin enhanced chemiluminescence using a scintillation counter. Values are means of the percentage of change in basal production +SEM from six different preparations of mouse livers. * different from AMD, $p < 0.05$; ‡ different from AMD, UDCA or NCX-1000, $p < 0.05$.

Figure 14 The concentration-dependent effect of amiodarone on MDA concentration in hepatocytes and the effect of UDCA, SNP, NCX-1000, BHT, vitamin C, and vitamin E on the increase of MDA concentrations induced by amiodarone. Hepatocytes were cultured in Williams medium E in presence of 50 μM amiodarone with 20 μM UDCA, NCX-1000, SNP, vitamin E, vitamin C or 40 μM BHT for 20 h. MDA concentrations in cultured hepatocytes were measured after protein precipitation and liquid-liquid extraction, and HPLC separation with a diode array detector. Values are means of MDA concentration+SEM from at least 4 different preparations of mouse livers. *Significantly different from control and vitamin E, $p < 0.05$; ** Significantly different from AMD 50 μM , UDCA, BHT and vitamin C, $p < 0.05$; † Significantly different from AMD 50 and 100 μM , UDCA, BHT and vitamin C, $p < 0.05$.

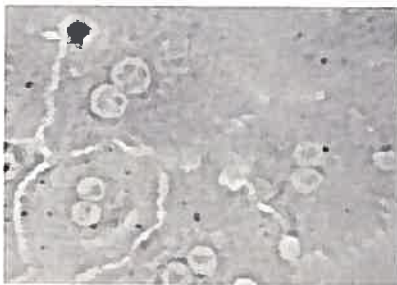
FIGURES

Figure 8

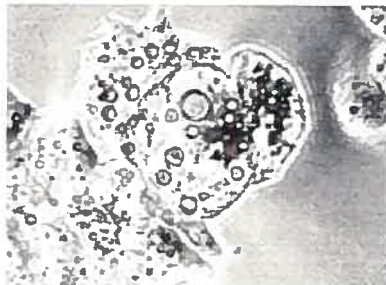
A



B



C



D

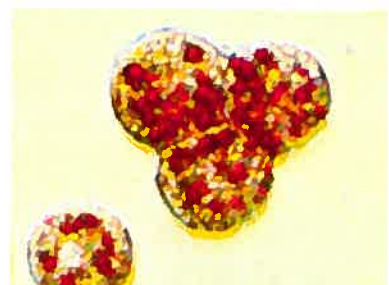


Figure 9

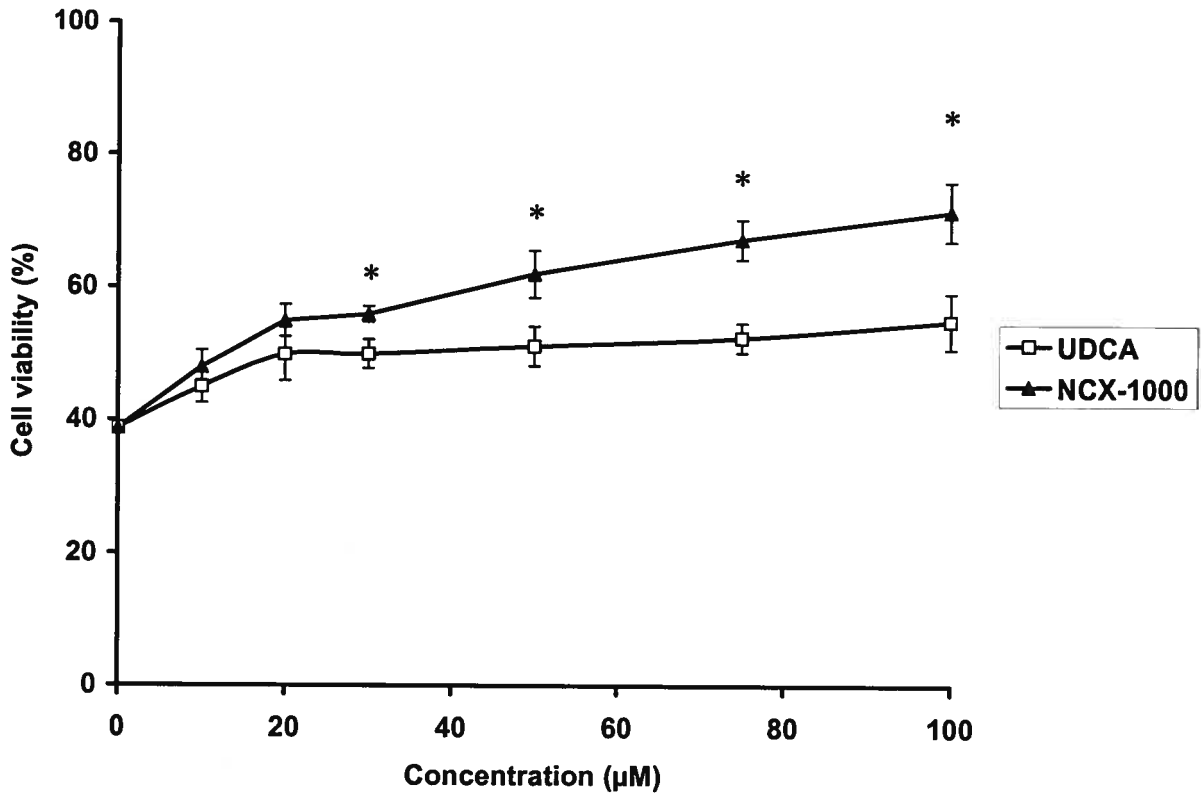


Figure 10

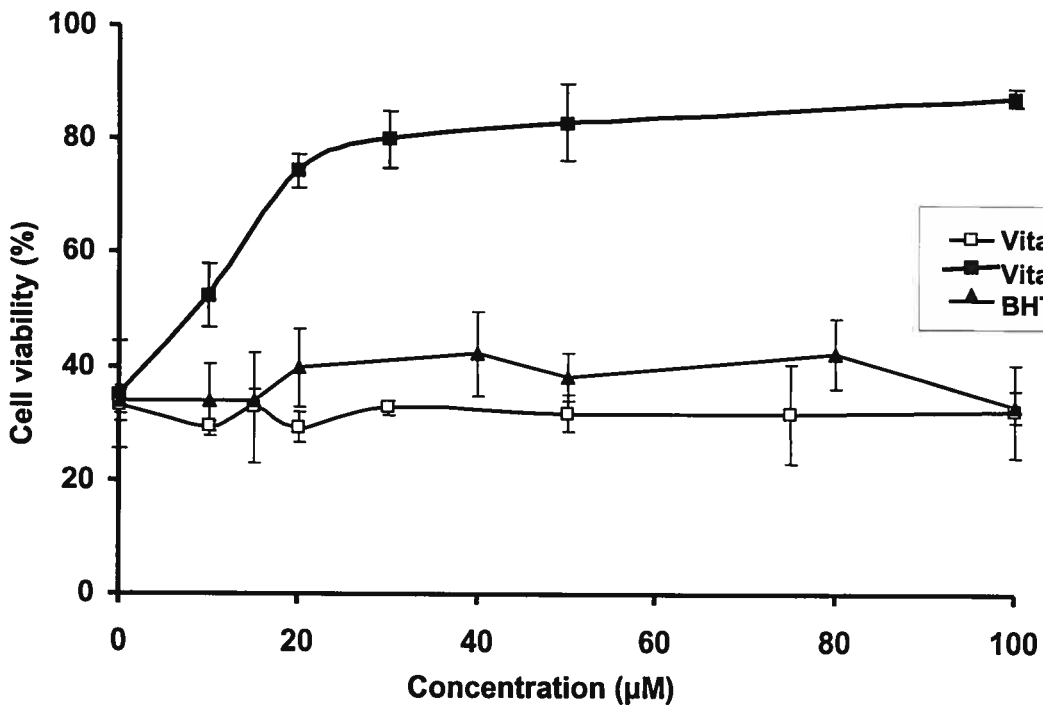


Figure 11

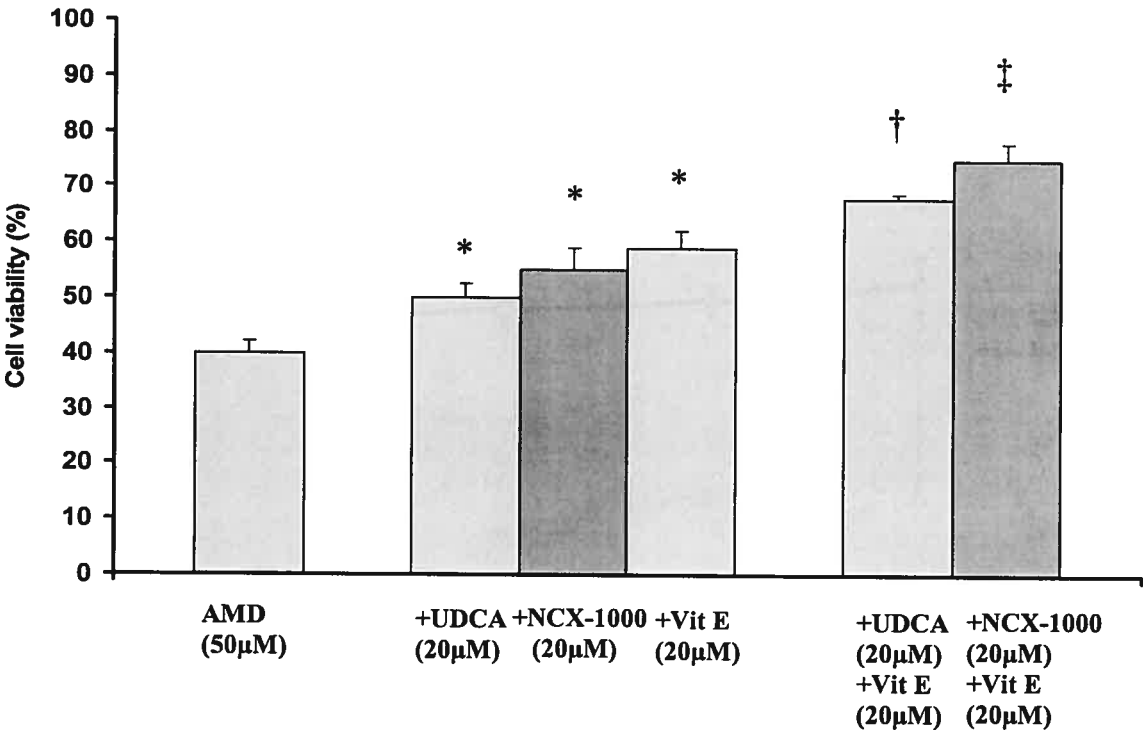


Figure 12

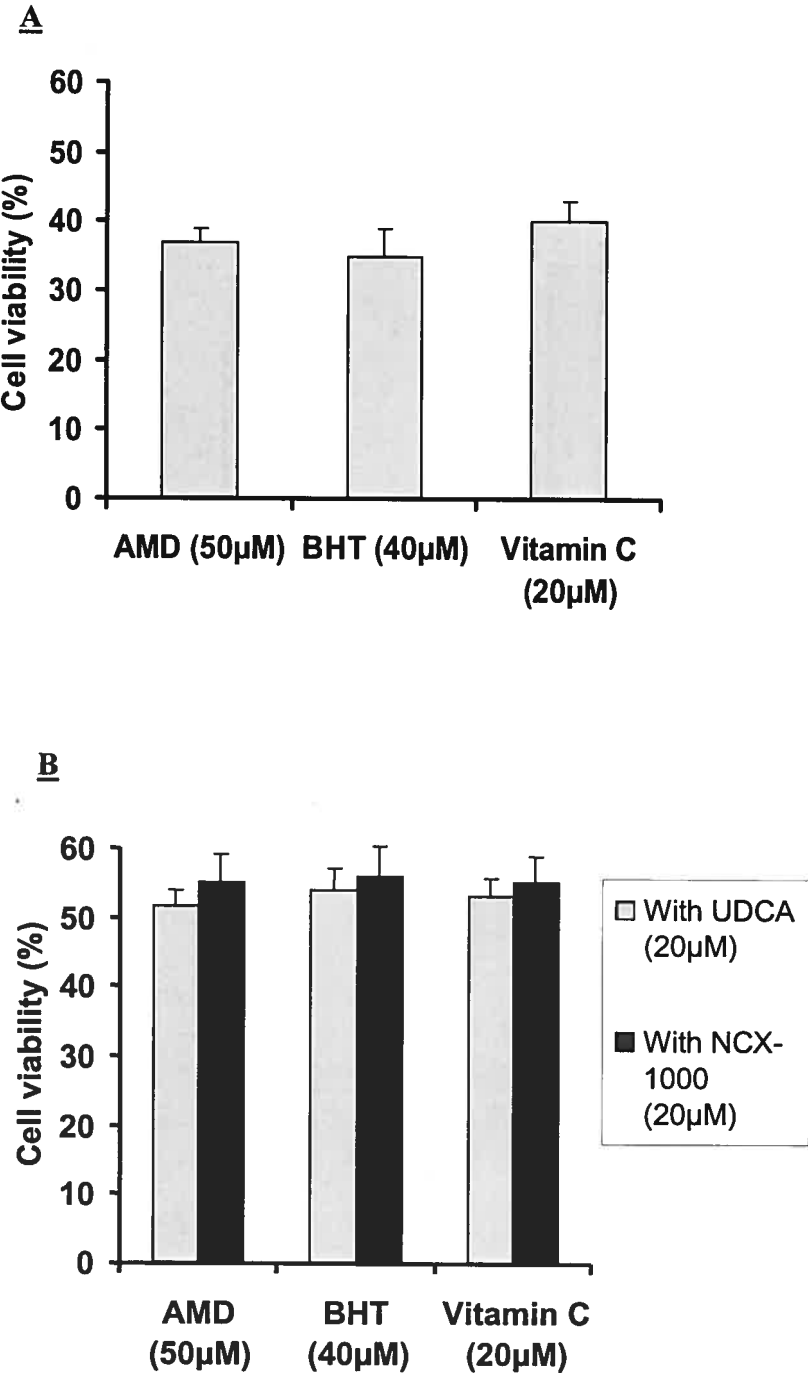


Figure 13

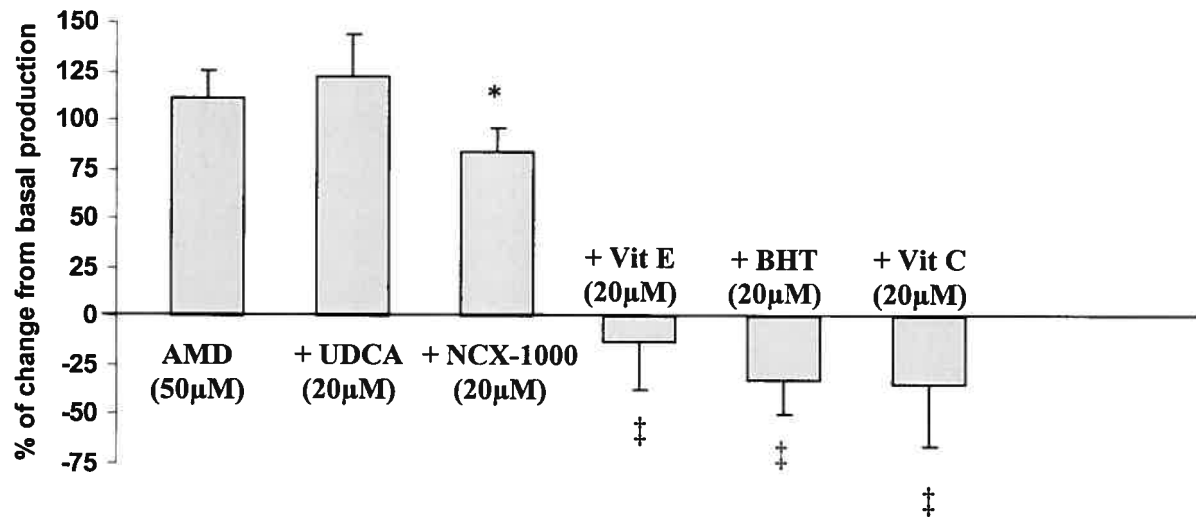
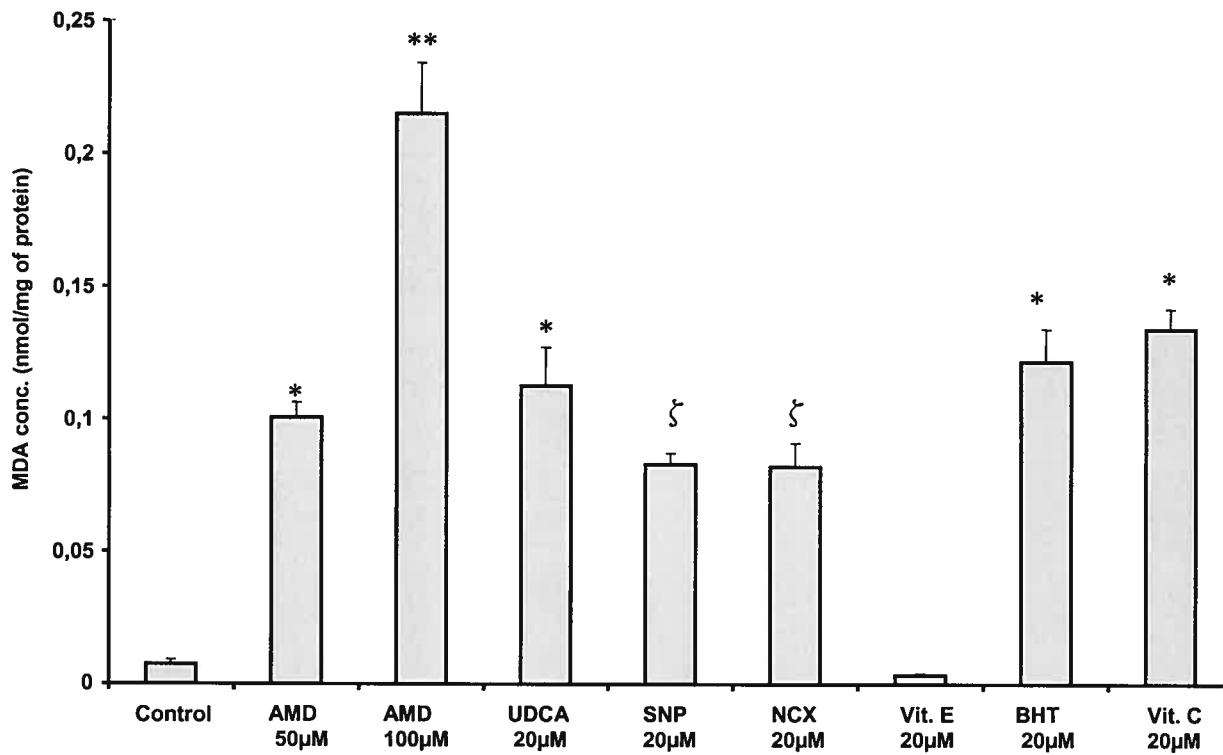


Figure 14



ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Dr. Marc Bilodeau and his team (Université de Montréal Hospital Research Center, St-Luc Hospital) for their help with the mouse hepatocyte isolation and culture procedures. Dr. Jacques De Champlain and his laboratory (Physiology, Université de Montréal) are thanked for their precious help with the lucigenin assay. Dr. Blandine Comte and Dr. Émile Lévy (Ste-Justine Hospital Research Center, Université de Montréal) are also thanked for their help with the MDA assay.

Montréal, le Jeudi 23 Décembre 2004

Objet : Déclaration des coauteurs d'un article

À qui de droit,

Je désire vous informer que j'ai été dans l'impossibilité d'obtenir la signature des coauteurs Aziz Elimadi et Allal Chabli car ils ne font plus partie de l'équipe de recherche du Dr. Pierre Haddad. Malgré de nombreuses tentatives, je n'ai pas été en mesure de les contacter.

Merci de votre compréhension


Amine Ouazzani

DÉCLARATION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

1. IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Amine Ouazzani Chahdi
M.Sc. en Pharmacologie

2. DESCRIPTION DE L'ARTICLE

TITRE: Combination of Ursodeoxycholic acid or NCX-1000 with lipophilic antioxydants provides a better protection to mouse hepatocytes against amiodarone toxicity

AUTEURS: Amine Ouazzani Chahdi, Aziz Elimadi, Allal Chabli, Jean Spénard, Patrick Colin et Pierre S. Haddad

L'article est complet et sera soumis pour publication à la revue *Gastroenterology* en septembre 2004

3. DÉCLARATION DE TOUS LES COAUTEURS AUTRES QUE L'ÉTUDIANT

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Amine Ouazzani Chahdi inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre :

La combinaison de l'UDCA ou du NCX-1000 avec des antioxydants liposolubles procure une meilleure protection aux hépatocytes de souris contre la toxicité de l'amiodarone.

Aziz Elimadi :

Date :

Allal Chabli :

Date :

Jean Spénard

Date : 10 sept 2004

Patrick Colin :

Date : 22 sept 04.

Pierre S. Haddad :

Date : 8 sept. 2004

CHAPITRE III : DISCUSSION

Outre la résistance à l'insuline et l'obésité, certains composés chimiques peuvent occasionner l'accumulation de graisses au niveau du foie ainsi que des lésions de stéatohépatite. Parmi ces composés, on retrouve les amines cationiques amphiphiles dont l'amiodarone, un médicament antiarythmique. Par conséquent, l'amiodarone peut causer un syndrome semblable au NASH tant chez les animaux que les humains. Le mécanisme par lequel l'amiodarone induit ces effets a été bien caractérisé et serait dû en majeure partie à la dysfonction mitochondriale. En effet, d'une part, l'amiodarone inhibe la β -oxydation mitochondriale induisant une accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, d'autre part, elle bloque la chaîne respiratoire mitochondriale, causant un accroissement du stress oxydatif.

Les biopsies du foie tirées de patients souffrant du NASH présentent fréquemment des anomalies hépato-cellulaires très caractéristiques. La première consiste en la présence de zones de nécrose lobulaire associée à la présence d'hépatocytes ballonnés. De plus, ces hépatocytes présentent une surcharge de vésicules lipidiques ainsi que des méga-mitochondries qui sont des signes de dommages mitochondriaux. On note aussi la présence de cellules apoptotiques.

Nous avons choisi le modèle de la toxicité de l'amiodarone comme modèle expérimental. Ainsi, la première étape consistait à caractériser les effets de ce médicament sur la viabilité et la morphologie des hépatocytes de souris en culture afin de confirmer la représentativité du modèle par rapport aux lésions hépatocytaires observées dans le NASH. Les premiers résultats obtenus confirment l'existence d'une courbe dose-effet pour la perte de viabilité engendrée par l'amiodarone après 20 heures d'incubation. L'amiodarone induit donc la mort des hépatocytes d'une manière dose-dépendante. De plus, cette mort cellulaire semblait nécrotique tel que démontré par l'absence des changements de la morphologie nucléaire des hépatocytes. En effet, l'apoptose se caractérise par la condensation ainsi que la fragmentation de la chromatine, phénomènes qui ne touchaient qu'une proportion de 2 à 4 % des cellules en culture dans les conditions contrôle et qui n'a pas été affectée par

l'amiodarone. Par la suite, des expériences de décours temporel ont été effectuées pour s'assurer que l'apoptose ne se manifesterait pas en des délais plus courts. Les résultats obtenus démontrent encore une fois que, dans notre modèle, l'amiodarone induit la mort cellulaire nécrotique et non pas apoptotique et ce, d'une manière dépendante du temps d'incubation.

L'absence d'apoptose dans notre modèle *in vitro* est en contradiction avec certaines études qui suggèrent que l'apoptose est une caractéristique prédominante du NASH⁽⁶²⁾. En effet, Feldstein et ses collaborateurs ont observé que les cellules positives au TUNEL (TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick end labelling) étaient significativement plus nombreuses dans les biopsies des patients souffrant du NASH que chez les contrôles ayant une simple stéatose. De plus, ils ont aussi démontré que l'expression du récepteur Fas et de son ligand à la surface cellulaire est significativement accrue dans le NASH, ce qui contribuerait à la mort apoptotique des hépatocytes avoisinants.

Parallèlement à cette mort cellulaire, les travaux récents de Varbiro⁽⁶³⁾ en microscopie électronique, démontrent que l'amiodarone cause le gonflement des mitochondries et induit la formation de méga-mitochondries au sein des hépatocytes. Ces méga-mitochondries représentent des signes majeurs de la dysfonction de cette organelle. La même observation a été faite sur des biopsies de patients souffrant du NASH et pourrait expliquer en partie l'origine de la mort cellulaire dans cette pathologie. Par conséquent, il est suggéré que la dysfonction mitochondriale induite par l'amiodarone causerait l'épuisement des réserves d'ATP, principale source d'énergie de la cellule, ce qui nuirait au bon fonctionnement cellulaire. De plus, d'après la même étude, l'amiodarone favoriserait aussi l'ouverture du pore de transition mitochondrial et induirait la relâche de protéines toxiques de la matrice mitochondriale vers le cytosol, conduisant ainsi la cellule vers la nécrose cellulaire.

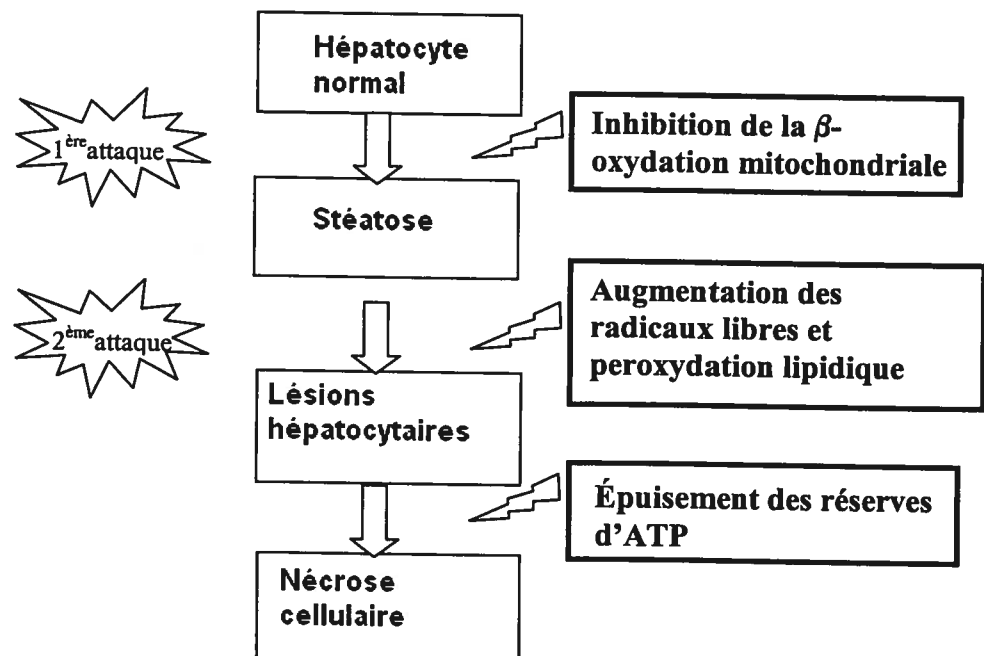
Dans notre modèle *in vitro*, la toxicité de l'amiodarone était aussi accompagnée d'importants changements de la morphologie cellulaire incluant l'apparition de vésicules claires de petite et moyenne taille à l'intérieur du cytoplasme des cellules figuraient parmi

ces changements. Le contenu lipidique des vésicules a été confirmé par la coloration avec le Oil Red-O, colorant spécifiquement les lipides neutres, tels que les triglycérides, contenus dans les cellules. Selon les travaux de Fromenty et Pessayre⁽⁶⁰⁾, l'accumulation de ces lipides dans le cytoplasme des hépatocytes serait causée par l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale, principale voie du métabolisme des acides gras, par l'amiodarone. Cet effet résulterait en une stéatose hépatique dans un modèle *in vivo*. De plus, le gonflement cellulaire observé pourrait être expliqué par la présence de ces vésicules lipidiques dans le cytoplasme. Ces changements morphologiques correspondent à ceux observés dans les biopsies des patients souffrant du NASH et semblent bien représenter la stéatose, première étape de la théorie des deux attaques de la pathogenèse du NASH. Les hépatocytes ainsi surchargés en lipides représentent donc un environnement très favorable au développement et à la perpétuation du stress oxydatif.

Dans notre cadre expérimental, l'amiodarone a aussi causé une augmentation significative de la production de l'anion superoxyde et du malondialdéhyde reflétant de manière respective le stress oxydatif et la peroxydation des lipides. Ces résultats témoignent de l'importance du rôle du stress oxydatif dans notre modèle et soutiennent les observations de l'équipe de Letteron⁽²⁵⁾ qui propose que la stéatose hépatique causée par l'amiodarone favorise la peroxydation des lipides dans un modèle de stéatohépatite chez la souris. Par ailleurs, en plus de l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale, Fromenty et ses collaborateurs⁽⁶⁰⁾ ont aussi démontré que l'amiodarone causait l'inhibition de la respiration mitochondriale au niveau du complexe I et II dans les hépatocytes isolés. L'interruption du transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire causerait l'accumulation des intermédiaires réduits pouvant transférer leurs électrons à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi l'anion superoxyde d'une manière exagérée. Ce dernier est un radical libre très réactif qui peut oxyder les dépôts de lipides dans les hépatocytes et causer une augmentation de la peroxydation lipidique. La suite logique de cette réaction est l'induction de lésions cellulaires qui, en association avec l'épuisement des réserves d'ATP, pourrait favoriser la mort cellulaire par nécrose.

Notre modèle *in vitro* de toxicité de l'amiodarone s'avère représentatif des dommages hépatocytaires observés chez des patients atteints du NASH, du point de vue des caractéristiques histologiques et pathophysiologiques. Ainsi, les mécanismes qui induisent ces lésions cellulaires correspondent bien à la théorie des deux attaques de la pathogenèse du NASH. (voir *Figure 8*).

Figure 15 : Mécanisme de toxicité de l'amiodarone dans les hépatocytes et similarités avec le modèle des deux attaques de la pathophysiologie du NASH



Les hépatocytes isolés représentent un bon système pour l'étude des fonctions hépatiques *in vitro* car ils préservent plusieurs caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques du foie plusieurs jours après leur mise en culture. Nos résultats obtenus sur les hépatocytes isolés démontrent que l'amiodarone causerait des dommages cellulaires qui miment ceux observés dans le NASH. Par contre, notre modèle ne reflète pas les autres caractéristiques du NASH. En effet, le NASH est une maladie multi-factorielle qui implique l'interaction entre plusieurs autres types cellulaires dont les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les macrophages. Toutes ces cellules contribuent grandement à l'inflammation et à la fibrose caractéristiques du NASH. Cependant, le

modèle développé dans ce travail de maîtrise a confirmé les bases cellulaires et biochimiques d'une lésion s'apparentant au NASH. Ainsi, il peut être utile pour cribler plusieurs composés et déterminer ceux qui présentent un potentiel thérapeutique intéressant pour des études *in vivo*.

L'acide ursodeoxycholique est un sel biliaire réputé pour ses effets cytoprotecteurs, qui pourraient réduire l'importance des dommages cellulaires causés par l'amiodarone. À prime abord, lorsqu'administré seul aux hépatocytes en culture, l'UDCA ne démontre aucune toxicité et n'affecte ni la viabilité ni la morphologie des cellules. En fait, l'UDCA a été utilisé depuis longtemps pour le traitement de la cirrhose biliaire primitive et possède un excellent profil d'innocuité. Dans notre étude, le pré-traitement des hépatocytes avec l'UDCA a protégé contre la cytotoxicité de l'amiodarone. Cependant, cet effet protecteur a atteint un maximum à une concentration de 20 μM et est demeuré stable à des concentrations supérieures. En 1995, Ravi Botla et ses collaborateurs⁽⁴⁶⁾ ont démontré que l'UDCA pouvait inhiber le pore de transition mitochondrial dont l'ouverture pouvait causer la mort cellulaire. De plus, dans un éditorial, Douglas Heuman, suggère que l'UDCA pourrait agir en stabilisant les membranes cytoplasmiques des hépatocytes, les protégeant ainsi contre les dommages causés par certains produits cytotoxiques. Ces deux mécanismes d'actions pourraient expliquer la capacité de l'UDCA à prévenir, du moins partiellement, la mort cellulaire induite par l'amiodarone.

Une étude publiée en février 2004 par Serviddio⁽⁶⁴⁾ suggère que dans des hépatocytes de rat isolés, l'UDCA réduirait le stress oxydatif mitochondrial en induisant la synthèse *de novo* de glutathion, un des mécanismes antioxydants cellulaires les plus importants. Cependant, dans notre cadre expérimental, l'UDCA n'a démontré aucun effet sur le stress oxydatif. En effet, nos expériences démontrent que l'UDCA ne réduit ni la formation cellulaire de l'anion superoxyde, ni la peroxydation lipidique, même à des concentrations atteignant 100 μM . Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par le fait que l'induction du stress oxydatif dans les deux contextes expérimentaux est fortement différente, l'une étant par l'éthanol et l'autre par l'amiodarone. De plus, contrairement au milieu de culture utilisé dans nos expériences, celui utilisé par l'équipe de Serviddio

contenait une forte concentration de N-acétylcystéine (0.5 mM) qui est un précurseur du glutathion et qui pourrait avoir joué un rôle dans l'effet attribué à l'UDCA dans leurs expériences.

Tout récemment, Keith Lindor en collaboration avec Axcan Pharma ont conduit une des premières études cliniques d'envergure sur le NASH, dans laquelle 166 patients ont été randomisés soit dans un groupe placebo, soit dans un groupe traité avec l'UDCA à une dose variant entre 13 et 15 mg/Kg pour une période de 2 ans. Cette étude tenait compte des paramètres biochimiques et histologiques du foie. Les résultats ont été publiés dans la revue *Hepatology* en 2004 et démontrent une amélioration de la biochimie et de l'histologie hépatique du NASH, mais à un degré similaire dans les deux groupes, suggérant que l'UDCA n'est guère plus efficace que le placebo chez les patients souffrant du NASH⁽⁶⁵⁾. Par contre, lors de cette étude, la majorité des patients ont eu des habitudes de vie plus saines, indiquant qu'une meilleure alimentation et de l'exercice physique seraient bénéfiques pour ces patients.

L'échec de la thérapie par l'UDCA nous a amenés à explorer l'efficacité d'une nouvelle molécule, le NCX-1000, dans le contexte du NASH. Le NCX-1000 est formé d'une molécule d'UDCA à laquelle a été greffée une molécule de monoxyde d'azote (NO) à l'aide d'un espaceur chimique qui est l'acide ferrulique. Cette molécule fait partie de la gamme des médicaments qui relâchent du NO qui inclut le NCX-701 dérivé de l'acétaminophène et le NCX-4016 dérivé de l'aspirine. Ainsi, chez des modèles animaux, le NCX-1000 est une molécule qui, après son absorption, est captée directement par foie pour y libérer le NO d'une manière contrôlée⁽⁵¹⁾. Des études effectuées par l'équipe italienne de Stefano Fiorucci démontrent que contrairement à l'UDCA, le NCX-1000 protège le foie des souris contre les lésions cellulaires induites par le Fas en inhibant l'activité des caspases, conférant ainsi des propriétés anti-apoptotiques et immuno-modulatoires à cette molécule⁽⁵²⁾.

Dans notre modèle expérimental, le NCX-1000 a réduit la mort cellulaire causée par l'amiodarone d'une manière dose-dépendante. En fait, à des concentrations inférieures à 20

μM , le NCX-1000 a démontré un effet protecteur similaire à celui de l'UDCA. Cependant, le NCX-1000 devenait significativement plus efficace que l'UDCA à des concentrations supérieures à $20 \mu\text{M}$. La protection accrue des hépatocytes contre la toxicité de l'amiodarone pourrait être attribuable à l'effet du NO qui viendrait s'ajouter à celui de l'UDCA. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué le potentiel protecteur d'un donneur de NO standard, le nitroprusside de sodium (SNP). Les résultats obtenus démontrent que le SNP améliore légèrement la viabilité cellulaire, confirmant que le NO joue un rôle protecteur contre la toxicité de l'amiodarone chez les hépatocytes en culture.

Dans ce contexte, une étude récente effectuée par l'équipe de John Lemasters a démontré que le NO pouvait inhiber l'ouverture du pore de transition mitochondrial directement ou indirectement via un mécanisme guanylate cyclase et PKG-dépendants⁽⁶⁶⁾. En effet, ils ont démontré que le NO active la guanylate cyclase menant à une augmentation de la concentration de GMPc intra-cellulaire, qui à son tour activerait la PKG. Cette dernière aurait la capacité d'inhiber le pore de transition mitochondrial. Plusieurs protéines, comme le cytochrome C et DIABLO, résident en fait dans l'espace entre les membranes externes et internes de la mitochondrie. La sortie de ces protéines par le pore de transition mitochondrial peut causer la mort cellulaire⁽⁶⁶⁾. De plus, comme le démontrent les travaux de Kim et de Li, le NO inhiberait aussi l'activité des caspases, suggérant ainsi un autre mécanisme protecteur contre la mort cellulaire⁽⁶⁷⁾.

Dans notre étude, le NCX-1000, au contraire de l'UDCA, a réduit la production de l'anion superoxyde induite par l'amiodarone, suggérant ainsi que le NCX-1000 pourrait aussi avoir des propriétés antioxydantes. À la lumière de ces résultats, il serait possible que cette réduction de la production de l'anion superoxyde soit le résultat de sa réaction avec le NO pour former le peroxyde nitrite, un autre radical libre. Ce dernier pourrait aussi causer des dommages aux composantes cellulaires. Cependant, le NCX-1000 a aussi réduit la peroxydation lipidique dans notre modèle, ce qui confirme que le NCX-1000 posséderait effectivement des propriétés antioxydantes. En effet, les travaux de Freya⁽⁶⁸⁾ publiés en 2002, ont démontré que le NO, qui est une molécule liposoluble, est un antioxydant cellulaire très puissant qui réagit avec pratiquement tous les radicaux dérivés des lipides. Le

NO prévient ainsi la propagation de la peroxydation lipidique au sein des membranes plasmiques et des dépôts de lipides intracellulaires. D'autres études, dont celle de Joshi⁽⁶⁹⁾, soutiennent la notion que le NO, à de faibles concentrations, agirait comme antioxydant et protégerait les hépatocytes contre le stress oxydatif. Cependant, à plus hautes concentrations, ce même NO agirait comme pro-oxydant et accroîtrait les dommages cellulaires causés par les radicaux libres. Dans ce cas, comment expliquer l'effet protecteur dose dépendent du NCX-1000, même à des doses de 100 μ M ? La réponse réside dans la cinétique de libération du NO dans les hépatocytes. En effet, dans des modèles de rats, le NCX-1000 libère le NO d'une manière lente et constante⁽⁷⁰⁾. Puisque le NO est un gaz volatile qui se dissipe hors des hépatocytes assez rapidement, sa concentration intracellulaire ne devrait pas atteindre un niveau cytotoxique.

Dans l'ensemble, le NCX-1000 semble posséder un meilleur effet protecteur que l'UDCA contre la toxicité de l'amiodarone. De plus, cette protection accrue est dépendante de la dose et serait attribuable à l'effet cytoprotecteur de l'UDCA combiné à celui du NO dans les hépatocytes. Ce dernier pourrait exercer des effets protecteurs en inhibant le pore de transition mitochondrial et les caspases. Le NO possède aussi des propriétés antioxydantes comme le démontrent nos résultats sur la peroxydation des lipides. Le NCX-1000 pourrait démontrer des résultats encore plus encourageants dans les modèles *in vivo*, notamment à cause de ses effets cytoprotecteurs, anti-apoptotiques et immuno-modulateurs qui pourraient réduire la mort cellulaire et la réaction inflammatoire, prévenant ainsi l'apparition de fibrose au niveau du foie.

Le stress oxydatif joue un rôle prédominant dans notre modèle et dans la pathologie du NASH. L'utilisation d'agents antioxydants pourrait donc représenter une approche intéressante pour prévenir les lésions induites aux hépatocytes par les radicaux libres. Comme mentionné dans le chapitre I, plusieurs essais cliniques pilotes ont été effectués dans le but d'évaluer l'efficacité de ces agents dans le traitement du NASH. La majorité de ces études ont démontré des résultats encourageants avec la vitamine E, le SAME, la bétaine et le N-acétylcystéine. Cependant, une confirmation par des études mieux contrôlées et randomisées est requise. Dans le cadre de nos expériences, trois antioxydants

soit l' α -tocopherol, le BHT et l'acide ascorbique, ont été testés. Ces agents peuvent être classés selon leur solubilité dans les lipides, comme c'est le cas pour la vitamine E, ou leur solubilité aqueuse dans le cas du BHT et la vitamine C.

Tous ces antioxydants ont très efficacement neutralisé l'anion superoxyde produit par les cellules traitées avec l'amiodarone. Cependant, seule la vitamine E a réduit la peroxydation des lipides induite par ce traitement et a amélioré la viabilité cellulaire d'une manière dose-dépendante. Ces résultats suggèrent fortement que la nature lipophile de la vitamine E joue un rôle dans la prévention de la mort cellulaire dans notre modèle. En fait, de par sa nature, la vitamine E possède une affinité beaucoup plus élevée pour les lipides, dans lesquelles elle va se dissoudre et se concentrer. La présence de vitamine E au sein même des vésicules lipidiques intra-cellulaires et dans les membranes cellulaires contribue à la prévention et à l'interruption de la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides qui cause la perte de l'intégrité membranaire et la mort cellulaire. Dans le cas des antioxydants hydrosolubles, que sont la vitamine C et le BHT, ils seraient confinés dans l'environnement aqueux du cytoplasme où, bien que pouvant neutraliser les radicaux libres, ils ne peuvent interrompre la peroxydation lipidique. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de l'équipe de Ruch⁽⁷¹⁾. Celle-ci a démontré sur des hépatocytes de rat que, vu son hydrosolubilité, le BHT ne peut prévenir la toxicité de l'amiodarone et que seule la vitamine E était efficace à ce niveau.

Par contre, il est possible que la vitamine E, en s'incorporant à la membrane cytoplasmique, puisse modifier celle-ci au point de bloquer l'entrée de l'amiodarone dans les cellules. La vitamine E pourrait ainsi prévenir la toxicité de l'amiodarone par un mécanisme indépendant de son effet antioxydant. Cependant, au niveau de la morphologie cellulaire, la toxicité de l'amiodarone est caractérisée par des changements majeurs. Or, ces changements ont été observés à un même degré dans les cellules traitées ou non avec la vitamine E. Ceci suggère que l'amiodarone a bel et bien pénétré dans la cellule et a exercé ses effets cytotoxiques.

Les résultats obtenus avec la vitamine E pourraient donc expliquer, au niveau des hépatocytes, l'amélioration des aspects biochimiques et histologiques observés par Lavine⁽⁴¹⁾ et Hasewaga⁽⁴²⁾ lors des études pilotes menées dans le cadre du NASH. Ce traitement mériterait donc une investigation clinique plus approfondie.

Puisque l'UDCA et le NCX-1000 semblent avoir des mécanismes d'action différents de ceux des antioxydants, la combinaison de chacun de ces composés avec des antioxydants semble être une stratégie prometteuse. En concordance avec les observations précédentes sur les antioxydants, la combinaison de l'UDCA ou du NCX-1000 avec le BHT et la vitamine C n'a pas résulté en un meilleur effet protecteur contre la cytotoxicité de l'amiodarone.

Par contre, le traitement des hépatocytes en culture avec la combinaison de 20 μ M d'UDCA et de vitamine E a résulté en une meilleure prévention de la toxicité de l'amiodarone chez les hépatocytes isolés par rapport à l'UDCA ou la vitamine E seuls. Cet effet était additif et suggère que ces derniers possèdent des mécanismes d'action différents. L'UDCA agirait en inhibant le pore de transition mitochondrial et en stabilisant les membranes cellulaires, et la vitamine E en réduisant le stress oxydatif et la peroxydation des lipides.

Comme ce fut le cas pour l'UDCA, la combinaison du NCX-1000 avec la vitamine E a engendré une meilleure viabilité cellulaire que chacun des composés pris séparément. À la concentration de 20 μ M l'effet du NCX-1000 ne semblait pas statistiquement différent de celui de l'UDCA. Cependant, cette combinaison a démontré une meilleure protection des hépatocytes. Là encore, on pourrait suggérer l'effet additionnel du NO pour expliquer cette différence. Ainsi, dans notre cadre expérimental, l'effet cytoprotecteur de l'UDCA ou du NCX-1000 semble s'additionner avec l'effet antioxydant de la vitamine E pour protéger les hépatocytes d'une manière beaucoup plus efficace. La combinaison de la vitamine E avec le NCX-1000 semble plus efficace qu'avec l'UDCA à cause de l'effet protecteur supplémentaire du NO.

CHAPITRE IV : CONCLUSION

L'étude entreprise nous a permis de mettre au point un modèle *in vitro* qui mime les lésions hépatocytaires rencontrées dans le NASH. Nous avons également mis en évidence le rôle de la dysfonction mitochondriale et du stress oxydatif dans ce modèle. De plus, il a été possible d'évaluer l'effet de l'UDCA et du NCX-1000 seuls, ou en combinaison avec des antioxydants, dans la prévention des dommages cellulaires induits par l'amiodarone. Ces combinaisons se sont révélées très efficaces dans ce contexte.

Cependant, le NASH est une maladie qui implique l'interaction entre plusieurs types cellulaires ainsi qu'une multitude de médiateurs dans un milieu génétiquement favorable. Notre modèle *in vitro* ne tient pas compte de ces facteurs. La suite logique de ce projet devrait donc s'effectuer dans un modèle *in vivo* afin de confirmer les observations obtenues jusqu'à présent.

Finalement, les résultats obtenus dans la présente étude fournissent une piste de recherche intéressante pouvant mener au développement en clinique d'une thérapie innovatrice efficace contre le NASH en combinant le NCX-1000 et la vitamine E.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):3-16.
- 2) Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull.* 1997;53(2):238-52.
- 3) Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37(4):917-23.
- 4) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37(5):1202-19.
- 5) Contos MJ, Synyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of non alcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol.* 2002;9:37-51.
- 6) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experience with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:434-8.
- 7) Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? *Gut* 2002;50(5):585-8.
- 8) James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol.* 1998;29(3):495-501.
- 9) Te Sligte K, Bourass I, Sels JP, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med.* 2004;15(1):10-21.
- 10) Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001;121(3):710- 23.
- 11) Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology* 1998;114:842-5
- 12) Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Med Wkly.* 2002;132(35-36):493-505.
- 13) Deschênes M. La stéatohépatite non alcoolique. *Le Médecin du Québec,* 2002;37(10)
- 14) Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science* 1991;254:573-6.

- 15) Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 1992;90:1323-7.
- 16) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increase in adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95:2409-15.
- 17) Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997;389:610-4.
- 18) Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 2001;293:1673-7.
- 19) Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest.* 1997;100:3105-10.
- 20) Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002;35:762-71.
- 21) Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, et al. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-410.
- 22) Davidson NO, Shelness GS. Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:169-93.
- 23) Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002 Oct;16(5):663-78.
- 24) Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(8):1497-502.
- 25) Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol.* 1996;24(2):200-8.
- 26) Neuschwander-Tetri B, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR- γ ligand rosiglitazone. *Hepatology* 2003;38(4):1008-17.
- 27) McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002;34:255-62.

- 28) Burton GW, Ingold KU. Vitamin E application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts Chem Res.* 1986;19:194–201.
- 29) Lee KS, Buck M, Houglum M, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest.* 1995;96:2461–8.
- 30) Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35:62-73.
- 31) Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor β 1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J.* 1997;11:851-7.
- 32) Phung N, Farrell G, Robertson G, George J. Vitamin E but not glutathione precursors inhibits hepatic fibrosis in experimental NASH exhibiting oxidative stress and mitochondrial abnormalities [Abstract]. *Hepatology* 2001;34:361.
- 33) Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor- β 1 level and efficacy of α -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:1667-72.
- 34) Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, et al. Leptin receptor-mediated signalling regulates hepatic fibrogenesis and remodelling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399–410.
- 35) Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:193-9.
- 36) Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282(2):193-9.
- 37) Franssila-Kallunki A, Rissanen A, Ekstrand A, Ollus A, Groop L. Effects of weight loss on substrate oxidation, energy expenditure, and insulin sensitivity in obese individuals. *Am J Clin Nutr.* 1992;55:356–61.
- 38) Franssila-Kallunki A, Rissanen A, Ekstrand A, Ollus A, Groop L. Weight loss by very-low-calorie diets: effects on substrate oxidation, energy expenditure, and insulin sensitivity in obese subjects. *Am J Clin Nutr.* 1992;56(Suppl 1):247S–248S.
- 39) Eriksson S, Eriksson KF and Bondesson L. Non-alcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand.* 1986;220:83–8.

- 40) Fu Cs, Esrason K, Alshak NS, Conteas CN, Simmons VJ. Dietary Lecithin, antioxidant and vitamin B complex decrease hepatic steatosis on patients with NASH. *Gastroenterology* 1998;114:1243
- 41) Lavine JE. Vitamin E treatment of non-alcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr.* 2000;136:734–8.
- 42) Hasegawa T, Yoneda M, Kakamura K, Yokohama S, Tamori K, Sato Y. Diagnostic significance of measurement of serum transforming growth factor beta1 level and effect of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 1997;112:A1278.
- 43) Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(11):2485-90.
- 44) Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with non-alcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2711–7.
- 45) Pares A, Caballeria L, Rodes J, Bruguera M, Rodrigo L, Garcia-Plaza A, Berenguer J et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. *J Hepatol.* 2000;32(4):561-6.
- 46) Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(2):930-8.
- 47) Okan A, Astarcioglu H, Tankurt E, Sagol O, Altekin E, Astarcioglu I, Gonen O. Effect of ursodeoxycholic acid on hepatic steatosis in rats. *Dig Dis Sci.* 2002;47(11):2389-97.
- 48) Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, et al. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 1996;23:1464–7.
- 49) Ceriani R, Bunati S, Morini L, et al. Effect of ursodeoxycholic acid plus diet in patients with non-alcoholic steatohepatitis [abstract]. *Hepatology* 1998;28:386A.
- 50) Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004;39(3):770-8.

- 51) Fiorucci S, Antonelli E, Morelli A. Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. *Dig Liver Dis*. 2003;35 Suppl 2:S61-9.
- 52) Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Del Soldato P, Morelli A, Ignarro LJ. An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2652-7.
- 53) Dunn CJ, Peters DH. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs* 1995;49(5):721-49.
- 54) Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-4.
- 55) Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;27(1):187-95.
- 56) Oruc N, Dereli D, Yilmaz C, Yuce G, Gunsar F, Akarca US. Beneficial effects of insulin sensitizing agents on fatty liver disease; preliminary results. [Abstract] *J Hepatol* 2003;38(Suppl. 2):198
- 57) Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol*. 1996;24:200-8.
- 58) Fromenty B, Fisch C, Labbe G, Degott C, Deschamps D, Berson A, Letteron P, Pessayre D. Amiodarone inhibits the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255(3):1371-6.
- 59) Flaharty KK, Chase SL, Yaghsejian HM, Rubin R. Hepatotoxicity associated with amiodarone therapy. *Pharmacotherapy* 1989;9(1):39-44.
- 60) Fromenty B, Fisch C, Labbe G, Degott C, Deschamps D, Berson A, Letteron P, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114(4):764-74.
- 61) Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(5):679-90.
- 62) Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Tanai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125(2):437-43.

- 63) Varbiro G, Toth A, Tapodi A, Veres B, Sumegi B, Gallyas F Jr. Concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(7):1115-28.
- 64) Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Vina J, Sastre J. Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 2004;39(3):711-20
- 65) Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004;39(3):770-8.. 62)
- 66) Kim JS, Ohshima S, Pediaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2004;39(6):1533-43.
- 67) Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1997;272:31138 -31148.
- 68) Freya Q. Schafer, Hong P. Wang, Eric E. Kelley, Kate L. Cueno, Sean M. Martin, Garry R. Buettner. Comparing B-Carotene, Vitamin E and Nitric Oxide as Membrane Antioxidants. *Biol. Chem.* 2002;383:671- 81.
- 69) Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR Jr. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11-12):1357-66.
- 70) Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status. *Cardiovasc Drug Rev.* 2004;22(2):135-46.
- 71) Ruch RJ, Bandyopadhyay S, Somani P, Klaunig JE. Evaluation of amiodarone free radical toxicity in rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 1991;56(1-2):117-26.