

Université de Montréal

Cibler le système digestif pour protéger le foie

Évaluation de l'efficacité prophylactique et thérapeutique de traitements de l'encéphalopathie hépatique dans un modèle murin de cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire

par Grégory Petrazzo

Faculté de médecine

Mémoire présentée
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biomédicales
option médecine expérimentale

Octobre 2019

© Grégory PETRAZZO, 2019

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Cibler le système digestif pour protéger le foie

Évaluation de l'efficacité prophylactique et thérapeutique de traitements de l'encéphalopathie hépatique dans un modèle murin de cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire

Présenté par

Grégory Petrazzo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Massimiliano Paganelli

Président-rapporteur

Dr Christopher Rose

Directeur de recherche

Dr Emmanuelle Brochiero

Membre du jury

Résumé

Introduction. L'encéphalopathie hépatique (HE) est une complication commune mais sévère des insuffisances hépatiques. La physiopathologie de l'HE provient essentiellement de l'ammoniac dérivé du métabolisme des bactéries intestinales. Le traitement standard pour les patients qui subissent des épisodes manifestes d'HE est le lactulose mais son observance est faible du fait d'effets secondaires inconfortables. La rifaximine est un candidat potentiel mais il n'y a pas de données issues d'essais cliniques suffisamment robustes pour supporter sa seule utilisation. Les traitements anti-fibrotiques sont une autre piste de traitement dans le sens où s'il est possible de prévenir l'avancement de la défaillance hépatique il est alors possible de diminuer la probabilité et la sévérité des épisodes. Deux études indépendantes ont été réalisées dans un modèle de ligature de la voie biliaire, la première étude pour évaluer l'efficacité de traitements thérapeutiques de l'HE (lactulose et rifaximine) utilisés seuls ou en combinaison pour réduire le taux d'ammoniac et améliorer le statut de l'HE; et la seconde étude, pour évaluer des traitements utilisés individuellement pour prévenir l'établissement de la fibrose (acide obéticholique, rapamycine, pirfénidone, acide ursodésoxycholique).

Matériel et méthodes. Les deux projets utilisent un modèle murin de ligature de la voie biliaire. Pour l'évaluation de la rifaximine, trois semaines après la chirurgie, les animaux sont séparés en cinq groupes en fonction du traitement reçu quotidiennement et du modèle : SHAM-VEH, pour les animaux ayant subi un simulacre de chirurgie de ligature de la voie biliaire (SHAM) et traité par le véhicule (VEH); BDL-VEH, pour les animaux ayant subi la chirurgie de ligature de la voie biliaire et traité par le véhicule; BDL-RIF, pour les animaux traités par la rifaximine (RIF); BDL-LAC, pour les animaux traités par le lactulose (LAC); BDL-LAC+RIF, pour les animaux traités par le lactulose et la rifaximin (LAC+RIF). Pour l'évaluation des composés anti-fibrotiques, une semaine après la chirurgie, les animaux sont séparés en six groupes en fonction du traitement reçu quotidiennement et du modèle : SHAM-VEH; BDL-VEH; BDL-OCA pour les animaux traités par l'obéticholique acide (OCA); BDL-RPM, pour les animaux traités par la rapamycine (RPM); BDL-UDCA, pour les animaux traités par l'acide ursodésoxycholique (UDCA); BDL-PFN pour les animaux traités par la pirfenidone (PFN). Les animaux sont alors évalués au cours du modèle pour leur survie, leur consommation de nourriture et leur poids. Les

paramètres biochimiques de la fonction hépatiques sont évalués en fin de modèle. Plus particulièrement, le projet sur les composés anti-fibrotiques comprend une analyse plus approfondie de la fibrose par histologie avec établissement du score MÉTAVIR et par mesure du contenu hépatique en hydroxyproline. Le projet rifaximine comprend des analyses comportementales pour évaluer l'HE mais également une mesure de l'œdème cérébral.

Résultats. Pour le projet rifaximine, aucun des deux composés testés (i.e. rifaximin et lactulose) seuls ou combinaison n'ont pas eu d'effets bénéfiques globaux en termes de survie, de croissance, de consommation de nourriture, de tests comportementaux, d'œdème cérébral, de paramètres biochimiques incluant l'ammoniac. Aucun des traitements pris séparément ou en combinaison n'a montré d'efficacité pour le traitement de l'HE. Pour le projet des composés anti-fibrotiques, certains composés ont entraîné une mortalité plus élevée. Aucune différence entre les traitements ne fut observée en termes de croissance, de consommation de nourriture, de paramètres biochimiques, d'histologie et de contenu en hydroxyproline.

Conclusions. Globalement, l'étude sur la rifaximine ne présente pas de résultats suffisamment concluants pour recommander l'utilisation de la rifaximine en remplacement ou en concomitance avec le lactulose. L'étude sur les composés anti-fibrotiques ne permet pas de mettre en évidence un composé capable de limiter la progression de la fibrose.

Mots-clés : Encéphalopathie hépatique, ligature de la voie biliaire, cirrhose, lactulose, rifaximine, acide obéticholique, rapamycine, pirfénidone, acide ursodésoxycholique.

Abstract

Introduction. Hepatic encephalopathy (HE) is a major but common complication of liver failures diseases. The physiopathology of HE mainly involves intestinal bacteria metabolism derived ammonia. The golden standard for patients who experience overt episodes of HE is lactulose but its observance is poor due to uncomfortable side effects. On the other hand, Rifaximin is a potent candidate but there is a lack of relevant data from clinical trials to support its sole use. Antifibrotic drugs are another category of treatment that can be useful in the setting of HE since it can prevent the onset of cirrhosis and thus of the liver failure, this can decrease the appearance and severity of the episodes. The aim of this study is to evaluate in a murine model of bile duct ligation the efficiency of therapeutic treatments (lactulose and rifaximin) alone or in combination to decrease blood ammonia and ameliorate HE status; and of prophylactic treatments (obeticholic acid, rapamycin, pirfenidone, ursodeoxycholic acid) individually to prevent the onset of fibrosis.

Materials and methods. The two projects used a murine model of bile duct ligation. For the evaluation of the efficiency of rifaximin, three weeks after surgery, the animals were sorted into five groups according to the treatment they received daily and according to the model : SHAM-VEH, for animals that underwent a mock surgery (SHAM) and were treated with vehicle (VEH); BDL-VEH, for animals that underwent a bile duct ligation surgery (BDL) and were treated with vehicle; BDL-RIF, for animals that were treated with rifaximin (RIF); BDL-LAC, for animals that were treated with lactulose (LAC); BDL-LAC+RIF for animals that were treated with lactulose and rifaximin (LAC+RIF);. For the evaluation of the effect of antifibrotic drugs, one week after surgery, the animals were sorted into six groups according to the treatment they received daily and according to the model : SHAM-VEH, BDL-VEH, BDL-OCA for animals that were treated with obeticholic acid (OCA); BDL-RPM, for animals that were treated with rapamycine (RPM); BDL-UDCA, for animals that were treated with ursodeoxycholic acid (UDCA); BDL-PFN, for animals that were treated with pirfenidone (PFN). All animals were evaluated during the model for survival, food consumption and growth. The biological parameters of the liver function were evaluated at the end of the model. More specifically, this project includes a deeper analysis on fibrosis through histological analysis with establishment

of the METAVIR score and measure of the content on hydroxyproline. The rifaximin project includes behavioural analysis to evaluate the HE status and measurement of cerebral edema.

Results. Concerning the rifaximin project, no difference can be established between the treatments in term of survival, growth, food consumption, behavioural tests, cerebral edema, biochemistry parameters including ammonia. No treatment, taken alone or in combination, showed efficacy to treat HE. Concerning the antifibrotic drug study, some compounds have shown an increase in mortality, although no difference can be observed on growth, food consumption, biochemistry parameters, histology or hydroxyproline content.

Conclusions. Overall, the study on rifaximin does not present strong and conclusive results on the sole use of rifaximin. According to the study on the antifibrotic drugs, no compounds show evidence of prevention of the onset of the fibrosis.

Key-words : Hepatic encephalopathy, bile duct ligation, cirrhosis, lactulose, rifaximin, obeticholic acid, rapamycin, pirfenidone, ursodeoxycholic acid.

Table des matières

Résumé	1
Abstract.....	3
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles.....	10
Liste des abréviations	11
Remerciements	14
Introduction	16
Le foie et les maladies hépatiques	16
Rôles du foie en conditions physiologiques	16
Architecture du foie	17
Le foie comme filtre métabolique	17
Le foie et la digestion	18
Physiopathologie et étiologie des atteintes hépatiques.....	18
Physiopathologie de la fibrose vers la cirrhose et au carcinome.....	18
Étiologie des atteintes hépatiques.....	19
Diagnostic des atteintes hépatiques	20
Prévention, traitements curatifs et palliatifs des maladies du foie	21
L'encéphalopathie hépatique.....	22
Définition de l'encéphalopathie hépatique	22
Classification de l'encéphalopathie hépatique	23
Physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique.....	25
Modèles expérimentaux de l'encéphalopathie hépatique.....	26
Traitements de l'encéphalopathie hépatique	27
Évaluation de l'efficacité de la rifaximine en comparaison du lactulose et de la combinaison des deux traitements pour le traitement de l'encéphalopathie hépatique dans un modèle murin de cholestase hépatique	28
Introduction	28

Contexte de l'étude.....	28
Rationalisation de l'étude.....	28
Objectifs de l'étude.....	30
Modélisation de l'étude.....	30
Matériels et méthodes.....	32
Réactifs et traitements.....	32
Modèle animal.....	32
Procédures chirurgicales.....	33
Mesure des biomarqueurs hépatiques.....	34
Mesure de l'ammoniac plasmatique.....	35
Mesure de l'œdème cérébral.....	35
Tests comportementaux (Rotarod, Elevated Plus Maze, Open-Field test, Novel Object Recognition, activité nocturne).....	36
Analyses statistiques.....	39
Résultats.....	41
Aucune différence significative de mortalité n'a pu être observée entre les différents traitements.....	41
Les différents groupes montrent une croissance globale et une consommation de nourriture globale normales et indifférenciées entre les animaux BDL.....	43
Les biomarqueurs de la fonction hépatique ne montrent pas d'amélioration significative apportée par les différents traitements.....	52
Les animaux BDL ne présentent pas d'œdème cérébral.....	58
La mesure de la coordination motrice et de l'apprentissage par Rotarod n'a pas mis en évidence de différence par les traitements.....	60
La mesure de l'exploration, de la locomotion et de la sensation de peur par Open-Field test et l'anxiété ainsi que la dépression par Elevated Plus Maze test ne montre aucune différence par les traitements.....	61
Les différents traitements montrent une amélioration de la mémoire à long terme.....	66
Aucune différence n'est observée dans l'exploration et la locomotion des animaux dans leur phase nocturne.....	68
Discussion et perspectives.....	72

Évaluation de composés anti-fibrotiques comme traitements prophylactiques de la cirrhose dans un modèle murin de cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire.....	77
Introduction	77
Contexte de l'étude	77
Rationalisation de l'étude	77
Objectifs de l'étude.....	79
Modélisation de l'étude	79
Matériels et méthodes.....	81
Réactifs et traitements	81
Modèle animal	82
Procédures chirurgicales.....	83
Mesure des biomarqueurs hépatiques.....	84
Histologie des tissus hépatiques	84
Mesure du contenu en hydroxyproline	85
Analyses statistiques.....	86
Résultats	88
Une augmentation anormale de la mortalité en fin de modèle nous oblige à redéfinir le modèle	88
Les différents groupes BDL montrent une croissance globale et une consommation de nourriture globale diminuées par rapport aux animaux SHAM mais indifférenciées entre les animaux BDL.....	91
Les biomarqueurs de la fonction hépatique montrent l'établissement d'une atteinte hépatique sans amélioration significative apportée par les différents traitements	97
Les paramètres histologiques confirment l'établissement de la fibrose hépatique sans amélioration significative apportée par les différents traitements.....	107
Discussion et perspectives.....	111
Conclusion.....	115
Bibliographie	118

Liste des tableaux

Tableau I.	Classification de l'HE selon le consensus de Vienne (1998).	23
Tableau II.	Classification de West-Haven pour évaluer la cognition en cas d'HE.....	24
Tableau III.	Score MÉTAVIR de l'ensemble de la cohorte.....	110

Liste des figures

Figure 1.	Graphique simplifié du plan d'étude établi.	31
Figure 2.	Analyse de survie dans les différents groupes expérimentaux.	42
Figure 3.	Croissance globale dans les différents groupes de traitements.....	44
Figure 4.	Consommation de nourriture globale dans les différents groupes de traitement. .	46
Figure 5.	Composition corporelle en masse grasseuse, masse maigre, masse hydrique totale et libre dans l'ensemble de la cohorte.	51
Figure 6.	Paramètres biochimiques dont l'ammoniac dans l'ensemble de la cohorte.	57
Figure 7.	Mesure de l'œdème cérébral dans les différents groupes.....	59
Figure 8.	Analyse de la coordination motrice, de la mémoire et des capacités d'apprentissage par Rotarod (J+35, J+36, J+37 après chirurgie).	60
Figure 9.	Mesure de la locomotion, de l'exploration et de la peur par Open-Field test (J+33 après chirurgie).	63
Figure 10.	Mesure de l'anxiété et de la dépression par Elevated Plus Maze test (J+34 après chirurgie).	65
Figure 11.	Mesure de la rétention mémorielle à court et long terme par Novel Object Recognition (J+31 et J+32 après chirurgie).	67
Figure 12.	Mesure de l'activité nocturne (nuit entre J+34 et J+35 après chirurgie).	71
Figure 13.	Graphique simplifié du plan de l'étude originellement établi.	80
Figure 14.	Analyse de survie dans les différents groupes expérimentaux.	90
Figure 15.	Analyse de la croissance globale (poids des animaux) dans les différents groupes expérimentaux.....	94
Figure 16.	Consommation de nourriture globale dans les différents groupes expérimentaux.	96
Figure 17.	Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe d'une semaine.	98
Figure 18.	Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe de trois semaines.	102
Figure 19.	Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe de quatre semaines.	106
Figure 20.	Mesure du contenu en hydroxyproline.	109

Liste des sigles

Inc. : Incorporate pour compagnie.

Etc. : Etcetera.

: Numéro.

i.p. : Intrapéritonéal.

s.c. : Sous-cutané.

n.s. : Non significatif.

Liste des abréviations

ALT : Alanine aminotransférase.

ANOVA : Analysis of variance traduit par analyse de variance.

AST : Aspartate aminotransférase.

BDL : Bile duct ligation traduit par ligature de la voie biliaire.

CA : California.

CHESS : Échelle de mise en scène de l'HE clinique.

CHUM : Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

CIPA : Comité institutionnel de Protection des Animaux.

CO : Colorado.

CRCHUM : Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

DMAB : Diméthylaminobenzaldéhyde.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

GGT : Gamma glutamyl transpeptidase.

GLDH : Glutamate déshydrogénase.

HAI : Hépatites auto-immunes.

HCl : Acide chlorhydrique.

HE : Hepatic encephalopathy traduit par encéphalopathie hépatique.

IRIC : Institut de Recherche d'Immunologie et Cancérologie.

J : Jour.

M : molaire ou mol/l.

MELD : Score de maladie hépatique en phase terminale.

MS.c. : *Magister Scientiae*.

NAFLD : Maladies du foie gras non lié à l'alcool.

NaOH : Sodium hydroxyde.

NASH : Stéatohépatite non alcoolique.

NJ : New Jersey.

OCA : Acide obéticholique.

ON : Ontario.

PAL : Phosphatases alcalines.

PELD : Score pédiatrique de maladie hépatique en phase terminale.

PFN : Pirfénidone.

Ph.D. : *Philosophiæ doctor*.

QC : Québec.

RPM : Rapamycine.

SAÉ : Service aux étudiants.

SEM : Standard error of the mean traduit par erreur type.

SHAM : Sham traduit dans ce contexte par simulacre de chirurgie de ligature de la voie biliaire.

UDCA : Acide ursodésoxycholique.

UdeM : Université de Montréal.

UK : United Kingdom traduit par Royaume-Uni.

USA : United States of America traduit par États-Unis d'Amérique.

VEH : Véhicule.

Écrire une thèse n'est pas une chose aisée, sans la présence de ma famille de cœur cela aurait été bien plus difficile et ces deux dernières années n'auraient pas été aussi belles. Entre tous, ce travail est dédié à Ève Honoré sans qui je ne serai pas à Montréal.

Remerciements

« Après quelques mois en [maîtrise], la plupart des sujets ressentent une détérioration de leurs facultés cognitives. Vous, ça fait nettement plus longtemps que vous y êtes, il n'est donc pas exclu que vous ayez quelques lésions irréversibles de rien du tout. Ne vous inquiétez pas, hein ! En fait, si vous vous inquiétez, c'est bien. C'est une réaction normale quand on vous dit que vous avez des lésions irréversibles. » Citation adaptée de Wheatley, Portal 2.

Je souhaite commencer mes remerciements par mon directeur de recherche, Christopher Rose, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Christopher m'a invité à traverser l'Atlantique pour rejoindre son équipe et m'a accueilli à bras ouverts dans son laboratoire. Outre l'expérience humaine, l'opportunité de travailler, de me former à l'UdeM et au CRCHUM fut à la fois formidable et de grande qualité. Je remercie fortement Christopher pour sa confiance car à ses côtés j'ai pu à de nombreuses occasions prendre des initiatives sur différents projets au sein du laboratoire. Christopher, je ne te remercierai jamais assez de la confiance que tu m'as accordée et de ton soutien, je vous souhaite de vivre de nombreuses années de prospérité au sein du laboratoire.

Je souhaite également remercier les membres du laboratoire Mariana Oliveira, doctorante, et Rafael Ochoa-Sanchez, post-doctorant, qui m'ont soutenu sans faillir durant ces deux ans de maîtrise. Mariana, je te souhaite le meilleur pour ton pré-doc et pour le reste de ton doctorat. Rafael, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière scientifique. Il m'est indispensable de remercier également Mélanie Tremblay, notre assistante de recherche, pour son travail impressionnant afin que le laboratoire prospère sans accroc. Mélanie, je te souhaite d'avoir la reconnaissance que tu mérites et de continuer à trouver du plaisir dans ton travail. Bien que je ne travaillasse pas sous sa direction, je souhaite remercier Chantal Bémour, chercheur et professeur agrégée dans le laboratoire, sa gentillesse, sa bonne humeur et son regard bienveillant furent très appréciés. Chantal, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière, qui je suis sûr sera pleines de succès. À tous les étudiants qui sont venus temporairement dans notre laboratoire, que j'ai eu la chance d'encadrer directement ou indirectement, notamment Julia Ruf et Sophie Mahé, merci pour l'expérience formidable que vous m'avez fait vivre. Je vous souhaite le meilleur pour votre vie personnelle et professionnelle.

À mes collègues du CRCHUM, Anaïs Szpigel, Hasna Maachi, Alexis Vivoli, Victor Mullins-Dansereau, merci pour les discussions et les pauses qui nous redonnent la motivation nécessaire pour continuer. Je vous souhaite de réussir vos études et vos carrières avec brio.

Je me dois de remercier Michel Paré et la compagnie Clementia pour avoir financé une partie de ma maîtrise à travers un contrat MITACS. Mais également les fonds Wilrose Desrosiers et Dunn pour m'avoir accordé une bourse dans le cadre du concours SAÉ de l'UdeM.

Un merci tout à fait spécial à tous ces streamers d'un talent inégalable, Benjamin Daniel alias « Benzaie », Frédéric Molas et Sébastien Rassiât du « Joueur du Grenier » et tant d'autres. Sans vous, mes journées auraient été beaucoup plus déprimantes et mon écriture infiniment moins productive.

Le plus important à mes yeux, ma famille de cœur à qui je dédie mon travail et ma vie, Ève Honoré, Anastasiya Shchukina, Luc Pineau, Teddy Andujar, Julia Ruf, Sophie Mahé, Camille Segonne, Denis But. Vivre avec vous ou partager vos vies même à distance est la plus belle chose qui soit et qui m'apporte une réelle joie. Ève, merci de m'aider à combattre la dépression des études sup. à grand coup de pizzas, de bières et de jeux AAA. Ne lâche rien pour ta thèse, je suis ton plus grand fan depuis toujours, je sais que tu réussiras tout ce que tu entreprends et que ça finira par payer. Anastasiya, tu es ma plus belle rencontre à Montréal, je n'aurais jamais imaginé meilleure collocation, il n'y a rien que je puisse te souhaiter car impossible n'est pas Anastasiya et je serai toujours là si tu as besoin de moi. Luc et Teddy, deux ans après vous avoir abandonnés vous êtes toujours là et j'espère que nous pourrions concrétiser nos projets. Ne vous tuez pas au travail ou dans vos études, n'oubliez pas de vivre. Julia et Sophie, au même titre qu'Anastasiya, vous faites partie de mes plus belles rencontres à Montréal et même si vous êtes parties nous ne nous oublierons jamais. Camille et Denis, merci d'être là tous les jours et de faire partie de notre petite famille, je vous souhaite le meilleur dans la fin de vos études. Percy qui nous a malheureusement quitté trop tôt et Léo, nos petites boules de poils, qui même s'ils entament sérieusement mon capital sommeil m'ont apporté un soutien affectif incomparable.

À tous, vous avez mon amour et ma reconnaissance,

Grégory Petrazzo.

Introduction

Dans le monde entier, les statistiques montrent que les maladies hépatiques sont en hausse et les estimations sont sans doute en dessous de la réalité. Toutes étiologies confondues, on estime à près de 900 millions de personnes atteintes de maladies du foie dont 2 millions décèdent chaque année (Prowpanga et *al.*, 2015). La mortalité associée à ces maladies est bien plus prédominante dans les pays en voies de développement (pays d'Asie et d'Afrique) du fait d'un accès restreint aux traitements. En 2010, les maladies du foie étaient la neuvième cause de décès dans le monde, sans compter les cancers du foie. D'ici 2020, les décès causés par cirrhoses seules seront la douzième principale cause de mortalité dans le monde (Murray et *al.*, 1997). Au Canada, en 2013, les tumeurs malignes incluant les cancers du foie étaient la première cause de mortalité; les maladies chroniques et la cirrhose du foie étaient la neuvième cause de mortalité dans la population générale et la cinquième cause de mortalité pour la population des 45 à 64 ans (CANSIM 102-0561). Cependant, les maladies du foie peuvent toucher aussi bien les nouveau-nés que les personnes âgées. Ainsi, un Canadien sur quatre va présenter un certain degré de maladie hépatique au cours de sa vie (Sanabria et *al.*, 2013). Les efforts de prévention, de traitement et de recherche sont d'une importance capitale dans une population vieillissante, qui se sédentarise et qui voit une forte augmentation des maladies cardiométaboliques du fait de l'obésité grandissante de sa population (Han et *al.*, 2016 et Sanabria et *al.*, 2013).

Le foie et les maladies hépatiques

Rôles du foie en conditions physiologiques

Le foie est le plus gros organe du corps humain (après la peau) et a de nombreux rôles et fonctions essentiels dans notre organisme. C'est un organe qui est principalement connu pour son rôle dans la détoxification des toxines qu'elles soient exogènes (alcool, médicaments, produits chimiques, etc.) ou endogènes (protéines, bilirubine, etc.). Mais le foie exerce environ 500 activités métaboliques différentes, il est notamment impliqué dans : le métabolisme énergétique en produisant, stockant et libérant de l'énergie; dans la production de protéines essentielles (facteurs de coagulation, albumine, etc.) et leur transport; l'homéostasie de

nombreuses hormones et substances essentielles; la production de bile impliquée dans la digestion (Corless et *al.*, 1983).

Architecture du foie

Le foie est un organe central situé dans le cadre supérieur droit du corps humain pesant entre 1 kg et 1,5 kg et séparé des poumons par le diaphragme. Au niveau macroscopique, le foie est divisé en quatre lobes (droit, gauche, caudé et carré), les lobes caudé et carré sont séparés par le hile du foie qui permet le passage de la veine porte, de l'artère hépatique et des canaux biliaires majeurs. La vésicule biliaire s'attache au niveau du lobe droit et du lobe carré (Abdel-Misih et *al.*, 2010).

Au niveau microscopique, le foie est constitué en millions de lobules hépatiques. Chaque lobule hépatique de forme hexagonal est constitué de milliers d'hépatocytes qui produisent et sécrètent la bile dans les voies biliaires. Au centre, la veine centrolobulaire collecte le sang artériel des artères hépatiques et le sang veineux des veines portales. Artères hépatiques, veines portales et voies biliaires se trouvent à chaque arête du lobule qui constitue les espaces interlobulaires ou espaces portes (Ishibashi et *al.*, 2009).

Le foie comme filtre métabolique

Le foie est un organe hautement vascularisé qui contient en tout temps environ 10 % du sang total d'un individu. Chaque minute, 1,5 L de sang (moyenne pour un adulte) le traverse. Il reçoit cet apport artériel d'une part de l'artère hépatique qui amène un sang oxygéné nécessaire aux fonctions et au maintien des cellules hépatiques, d'autre part de la veine porte qui apporte entre autres les éléments nutritifs provenant du tractus digestif qui seront métabolisés par le foie.

Les fonctions de détoxification du foie sont assurées par la présence de nombreuses enzymes et cycle enzymatique dans les hépatocytes. Par exemple, l'éthanol contenu dans les alcools est dégradé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase puis en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase qui peut alors être utilisé par l'organisme de différentes manières (entrée dans le cycle de Krebs, des acides gras, des citrates, etc.) (Grant, 1991). Mais également, le foie transforme l'ammoniac issu de la dégradation des protéines par les bactéries intestinales en urée via le cycle de l'urée qui est alors excrété dans les urines.

Le foie et la digestion

Le foie est une glande dont l'excrétion de bile joue un rôle important pour la digestion. Mis à part sa vascularisation importante, le foie est parcouru par de nombreuses voies biliaires qui collectent et acheminent la bile produite par les hépatocytes à travers le canal cholédoque dans le duodénum. Une partie de la bile est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire qui est reliée au canal cholédoque par le canal cystique.

La bile est un liquide jaune-verdâtre de pH basique qui favorise la digestion des lipides grâce à la présence de sels biliaires. Ces sels biliaires permettent ainsi l'émulsion des lipides qui sont alors plus sensibles à l'action de la lipase pancréatique ainsi que d'autres enzymes. Une partie des sels biliaires sécrétés peuvent retourner au foie après leur passage dans l'intestin via la veine porte (cycle de Schiff). Ces derniers ont montré une importance grandissante ces dernières années dans la physiopathologie des maladies hépatiques.

Physiopathologie et étiologie des atteintes hépatiques

Physiopathologie de la fibrose vers la cirrhose et au carcinome

En cas d'injure hépatique, de nombreux signaux de stress et pro-inflammatoires vont s'enclencher et initier un processus de fibrose. Cependant, le foie a une capacité de régénération importante et une lésion unique même sévère n'aura pas de conséquences importantes en termes de fibrose. De ce fait, la fibrose s'établit essentiellement dans les insuffisances hépatiques chroniques où les injures hépatiques sont continues et répétées. Il est cependant important de noter que l'HE peut être associée aux insuffisances hépatiques aiguës. Le processus de fibrose correspond essentiellement à l'accumulation de matrice extracellulaire, dont le principal constituant est le collagène. La fibrose hépatique s'accompagne d'un processus de cicatrisation, d'une réponse inflammatoire et d'une angiogenèse. Cette angiogenèse contribue à l'établissement d'une hypertension portale à long terme.

La consommation excessive d'alcool ou une alimentation déséquilibrée qui entraîne l'accumulation de lipides sont des facteurs qui vont entraîner de façon chronique la progression de la fibrose en exacerbant les processus de réparation.

La cirrhose correspond à l'évolution prolongée du processus de régénération des hépatocytes dans un contexte de fibrose et est définie par des caractéristiques histopathologiques de désorganisation des lobules hépatiques avec un remplacement des hépatocytes par du tissu cicatriciel qui entraîne une réorganisation architecturale du tissu et une perte progressive de fonctions de l'organe (Vojvodic et *al.*, 2014). Ainsi la cirrhose est définie par des critères morphologiques et par des perturbations de la fonction hépatique. La cirrhose s'établit consécutivement à des agressions répétées de diverses origines (biochimiques, virales, immunes, etc) qui se traduisent par un processus d'inflammation chronique (Detlef et *al.*, 2008).

La cirrhose provoque l'entrave du flux sanguin qui participe grandement à la détérioration des fonctions hépatiques. L'obstruction du flux sanguin dans le système porte provoque une augmentation de la pression sanguine dans ce dernier. L'hypertension portale est définie par une différence de 5 mmHg entre la circulation supra- et infra-hépatique. Ceci va provoquer l'apparition d'une circulation collatérale aboutissant à la formation de varices œsophagiennes. Plusieurs obstructions vont diminuer l'apport de sang et aboutir au cloisonnement fibreux du tissu hépatique. La fibrose empêche la régénération normale des hépatocytes qui s'effectue alors de manière chaotique. En parallèle, la perte des cellules hépatiques entraîne alors une insuffisance hépatocellulaire.

Contrairement à la fibrose, la cirrhose est irréversible et dans sa forme terminale se traduit par une insuffisance hépatique décompensée pouvant occasionner une encéphalopathie hépatique, des coagulopathies, de l'hypertension portale ou de l'ascite. Ces conditions nécessitent des interventions continues qui peuvent aller jusqu'à la greffe hépatique. Une minorité de patients peuvent également développer un carcinome hépatocellulaire (Pellicoro et *al.*, 2014).

Étiologie des atteintes hépatiques

Les étiologies des atteintes hépatiques diffèrent quelque peu si l'insuffisance hépatique est chronique ou aiguë.

Dans les pays industrialisés, le facteur d'insuffisance hépatique aiguë le plus fréquent (environ 50 %) est l'intoxication au paracétamol, les facteurs moins fréquents correspondent principalement aux causes infectieuses (hépatite B ou A) ainsi qu'à certaines causes non

infectieuses comme les syndromes ischémiques hépatiques (Budd Chiari aiguë), des intoxications autre que médicamenteuses et des atteintes auto-immunes (Morris et *al.*, 2013).

Les insuffisances hépatiques chroniques sont définies principalement par leur étiologie. Ainsi on peut définir les maladies du foie gras non lié à l'alcool (NAFLD), la stéatohépatite non alcoolique (NASH), les hépatites auto-immunes (HAI), les hépatites alcooliques, la cholangite biliaire primitive (CBP), les hépatites médicamenteuses, les hépatites virales et bactériennes. Les hépatites virales sont la cause la plus fréquente de cirrhose (Myers et *al.* 2014) malgré une avancée importante des NALFD et NASH dans les pays occidentaux. Il existe également d'autres étiologies qui entraînent des injures hépatiques qu'elles soient métaboliques (formation de calculs biliaires qui obstruent les voies biliaires) ou génétiques (maladie de Wilson, hémochromatose, déficit en alpha-1 antitrypsine).

Diagnostic des atteintes hépatiques

Le diagnostic des atteintes hépatiques comprend la revue des antécédents familiaux, du patient, un examen physique et des tests biochimiques et médicaux (Huard et *al.*, 2016).

Les paramètres biochimiques de la fonction hépatique qui doivent être considérés sont l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), les phosphatases alcalines (PAL), la bilirubine totale (TBIL), le taux de prothrombine normalisé en International Normalized Ratio (INR) et l'albumine sérique (ALB). Cela comprend également des tests spécifiques pour les hépatites.

Au Canada, il existe des outils informatiques spécialisés qui aident à la gestion des patients tels que l'iMD Santé Canada, une interface qui permet de faciliter le dialogue entre les soignants et les patients; et le LiverTox, une base de données régulièrement mise à jour. De nombreux scores ont également été établis pour adapter la prise en charge des patients en fonction des étiologies et de la démographie des patients :

- B-score pour l'hépatite B établit le risque de progression vers le carcinome hépatocellulaire.
- Fonction discriminante de Maddrey pour prédire le pronostic des hépatites liées à l'alcool.

- Score de Child-Pugh pour évaluer la gravité de la cirrhose.
- Scores pédiatrique et adulte de maladie hépatique en phase terminale (MELD et PELD) pour déterminer le pronostic et hiérarchiser les propriétés en matière de greffe de foie.

Il existe également des scores spécifiques à l'HE, tels que l'échelle de mise en scène de l'HE clinique (CHESS) et une fiche de suivi des symptômes de l'HE pour les patients et les soignants.

Prévention, traitements curatifs et palliatifs des maladies du foie

Le traitement des maladies chroniques du foie dépend fortement de l'étiologie de l'atteinte hépatique. Les principales étiologies des maladies chroniques du foie sont les hépatites d'origine virales, les syndromes métaboliques et la consommation excessive d'alcool.

Les maladies chroniques du foie ayant une origine virale concernent principalement les infections par le virus de l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'hépatite C (VHC). En termes de traitement, certains antiviraux peuvent être administrés tels que l'Entécavir, le Tenofovir, la Lamivudine, l'Adefovir dipivoxil, la Ribavirine ou l'Interferon α . Dans le cas de l'hépatite B, des injections d'immunoglobulines anti-VHB peuvent être considérées comme traitement prophylactique.

L'hémochromatose est une autre cause de maladie chronique du foie. L'hémochromatose est une maladie héréditaire qui provoque une élévation du fer. En temps normal, une enzyme hépatique, l'hepcidine, contrôle la manière dont le fer est utilisé et stocké. Dans le cas de l'hémochromatose, l'activité de cette enzyme est perturbée. Le traitement de l'hémochromatose consiste en des saignées (phlébotomies) permettant de réduire le taux de fer dans l'organisme. Alternativement, des traitements utilisant des chélateurs du fer peuvent être utilisés.

Pour les maladies chroniques du foie ayant une étiologie liée au mode de vie (consommation d'alcool, surpoids, obésité, dyslipidémie), le principal traitement consiste à modifier ses habitudes de vie en suivant des éléments de prévention. Dans le cas d'une consommation excessive d'alcool, le patient peut également suivre une cure de désintoxication.

La prévention des maladies hépatiques consiste à s'assurer que le patient soit proprement vacciné contre les causes virales et à identifier et éliminer les facteurs de risques de la vie des patients. Ces facteurs de risques comprennent l'usage de drogues, l'abus d'alcool, les habitudes sexuelles et alimentaires à risques ainsi que la gestion des prescriptions médicales.

Pour le cancer du foie, les traitements impliquent une résection du foie ou une hépatectomie partielle afin de retirer la ou les tumeurs. Certains traitements peuvent être utilisés pour réduire la taille des tumeurs comme la chimioembolisation transartérielle, l'ablation par radiofréquence ou par injection percutanée d'éthanol. Certains traitements médicamenteux ciblés ou de la radiothérapie peuvent également être utilisés.

La transplantation hépatique reste le seul véritable curatif pour le cancer du foie et les cirrhoses avancés.

L'encéphalopathie hépatique

Définition de l'encéphalopathie hépatique

L'encéphalopathie hépatique (HE) est une complication majeure, fréquente et réversible associée à une insuffisance hépatique aiguë ou chronique (Poordad, 2007). L'HE se manifeste par une myriade d'altérations neurologiques, cognitives, comportementales et psychologiques. Les manifestations de l'HE comprennent un large éventail de symptômes allant d'une légère altération de la cognition jusqu'à l'ataxie, le coma et la mort. L'HE peut être aggravée en présence de facteurs précipitants tels qu'une infection, de l'inflammation, des saignements gastro-intestinaux, la présence d'ascite ou de la constipation.

En cas d'insuffisance hépatique aiguë, les patients peuvent rapidement tomber en mort cérébrale associée avec un œdème cérébral et une hypertension intracrâniale. En cas d'insuffisance hépatique chronique, les symptômes s'établissent progressivement dans la durée avec des épisodes récurrents d'HE. À cet effet, différentes classifications ont été établies pour catégoriser les patients en fonction de la présence ou de l'absence de certains paramètres.

Classification de l'encéphalopathie hépatique

Une des principales classifications utilisées a été validée lors du 11th World Congress of Gastroenterology à Vienne en 1998 et permet de différencier les HE associées avec une défaillance hépatique aiguë (HE type A), les HE associées avec un shunt intrahépatique porto-systémique sans atteinte hépatique (HE type B) et les HE associées avec une défaillance hépatique chronique (HE type C). L'HE de type C est divisé en fonction de l'occurrence manifeste (HE manifeste) d'un épisode d'HE en HE épisodique (qui peut être précipitée, spontanée ou récurrente), en HE persistante (qui peut être légère, sévère ou dépendante du traitement) et en minimale HE dont l'occurrence n'est pas manifeste (Tableau 1).

Type d'HE	Nomenclature	Catégorie	Sous-catégorie	Sous-division
A	HE associées avec une défaillance hépatique aiguë			
B	HE associées avec un shunt intrahépatique porto-systémique sans atteinte hépatique			
C	HE associées avec une défaillance hépatique chronique	HE manifeste	HE épisodique	Précipitée Spontanée Récurrente
			HE persistante	Légère Sévère Dépendante du traitement
		HE minimale		

Tableau I. Classification de l'HE selon le consensus de Vienne (1998).

Ferency et al. (2002).

Les critères de West-Haven sont une classification spécifique à la défaillance hépatique chronique qui a été adoptée durant ce consensus afin de catégoriser les patients en fonction des altérations cognitives. (Tableau 2). A cet effet, de nombreux tests psychométriques ont été adaptés pour mesurer le degré d'altération cognitif, comportemental ou psychologique.

Grade	Symptômes
1	Diminution de l'attention
	Euphorie ou anxiété
	Diminution du temps d'attention
	Diminution de l'audition
2	Léthargie ou apathie
	Désorientation spatiale et temporelle mineure
	Diminution subtile de la personnalité
	Comportement(s) inapproprié(s)
3	Diminution de la capacité à soustraire
	Somnolence à demi-stupeur mais réponse normale à des stimuli vocaux
	Confusion
4	Désorientation importante
	Coma, absence de réponse à des stimuli vocaux

Tableau II. Classification de West-Haven pour évaluer la cognition en cas d'HE.

Ferency et *al.* (2002).

L'HE implicite aussi appelée minimale qui représente les prémices du développement des symptômes de l'HE peut affecter jusqu'à 80 % des patients atteints de défaillance hépatique (Rikkens et *al.*, 1978). Comme son nom l'indique, l'HE implicite n'est pas ostentatoire et manifeste mais se caractérise par des altérations légères des fonctions neurocognitives (Nardone et *al.*, 2016) et comprend dans les classifications l'HE minimale et l'HE de grade 1 (Bajaj et *al.*, 2011). L'HE implicite est associée avec un risque plus élevé de développer de l'HE manifeste et avec un risque de mortalité plus élevé (Sharma et *al.*, 2010). Bien que l'HE implicite ne

nécessite souvent pas d'hospitalisation, elle est un fardeau économique et pèse lourdement sur la qualité de vie (Groeneweg et *al.*, 1998).

Physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique

En dehors des facteurs propres et inhérents aux maladies du foie, la physiopathologie de l'HE est à la fois complexe et multifactorielle (Ochoa-Sanchez et *al.*, 2018). L'ammoniac est l'élément central de la physiopathologie de l'HE mais d'autres facteurs sanguins sont également impliqués dans la progression et la sévérité de la maladie, tels que le stress oxydatif, l'inflammation, les niveaux d'acides biliaires et le lactate.

L'hyperammoniémie sérique va entraîner une augmentation de l'ammoniac dans le cerveau, ceci est associé avec une ballonnisation des astrocytes qui peut entraîner une augmentation de la pression intracrânienne et de l'œdème. L'augmentation de la pression intracrânienne est principalement associée à l'œdème cérébral dans les cas de défaillance hépatique aiguë. Dans les cas de défaillance hépatique chronique, l'œdème cérébral n'est pas associé à la pression intracrânienne et on parle d'œdème de bas grade. Les œdèmes cérébraux émergent du fait de la disruption de la barrière hématoencéphalique qui entraîne un déséquilibre de l'osmolarité vers une hyperosmolarité cérébrale conduisant à la création de l'œdème cérébral. Les astrocytes du fait de leur ballonnisation et de leur perte de fonction sont au centre des perturbations au niveau cérébral, tant au niveau de la barrière hématoencéphalique que des neurones et de l'œdème cérébral. Les mécanismes impliqués incluent une dérégulation des canaux de l'aquaporine-4, l'altération de l'homéostasie sodique et potassique, l'accumulation extracellulaire de glutamate et l'accumulation intracellulaire de glutamine. Au niveau neuronal, la surexpression de neurotransmetteurs GABA est également impliquée dans la physiopathologie de l'HE par activation des récepteurs gabaergique (Jones, 2002).

De nombreux facteurs précipitants vont également aggraver la maladie, le principal étant la péritonite bactérienne spontanée, les autres incluant les saignements gastro-intestinaux, la constipation, l'augmentation de la part de protéine dans la diète, les infections du tractus urinaire, déséquilibre de l'ionogramme et l'utilisation de diurétique.

Modèles expérimentaux de l'encéphalopathie hépatique

Plusieurs modèles expérimentaux existent pour refléter les différents prismes de la maladie.

Les modèles *in vitro*, il est possible de cultiver des astrocytes, des cellules endothéliales et des neurones d'animaux.

Les modèles *in vivo* sont différenciés entre modèles reflétant les atteintes hépatiques aiguës et chroniques. Les modèles d'atteintes hépatiques aiguës comprennent essentiellement un modèle chirurgical par hépatectomie ou dévascularisation totale et deux modèles impliquant des traitements soit par acétaminophène, soit par thioacétamide. Les modèles d'atteintes hépatiques chroniques comprennent deux modèles chirurgicaux un premier d'anastomose porto-cave et un deuxième de ligature de la voie biliaire. Dans le modèle d'anastomose porto-cave, la veine porte est anastomosée à la veine sus-hépatique de manière à empêcher le flux de sang provenant de l'intestin d'être métabolisé par le foie; et bien que ce modèle récapitule un certain nombre de caractéristiques de l'HE, il n'y a pas de signes d'œdème cérébral ou d'altération significatives des astrocytes (formation de cellules d'Alzheimer de type 2). Le modèle de ligature de la voie biliaire provoque une destruction progressive du foie en créant une cholestase hépatique, ce modèle mime en partie les caractéristiques de l'HE, notamment au niveau des difficultés motrices et mémorielles.

Dans cette étude, nous utiliserons le modèle de chirurgie des voies biliaires. Ce modèle de double ligature et resection du canal biliaire commun produit un modèle de progression de cholestase biliaire et d'injures parenchymateuse hépatique. L'impact de la chirurgie et les complications associées à l'établissement du phénotype dépendent sur la durée du modèle. Après quatre semaines, l'établissement de l'injure parenchymateuse induit une hypertension portale et de l'ascite. Ce modèle développe des symptômes similaires à l'HE avec une hyperammoniémie, une inflammation, des comportements altérés, un œdème cérébral ainsi que du stress oxydatif (Butterworth et *al.*, 2009).

Traitements de l'encéphalopathie hépatique

Il n'existe pas de traitement réellement curatif de l'HE. La première ligne de conduite est de traiter la défaillance hépatique qu'elle soit aiguë ou chronique. Dans le cas d'une cirrhose alcoolique, le patient doit être pris en charge pour être suivi dans un programme d'abstinence de consommation d'alcool. Les cirrhoses virales peuvent être traitées avec des médicaments antiviraux afin de mitigés l'avancée de la cirrhose en carcinome hépatocellulaire. Pour les NASH, une prise en charge de l'hygiène de vie alimentaire et sportive des patients permet de freiner l'avancée de la maladie. Ultimement, la transplantation hépatique est la seule intervention qui permet de rétablir complètement les fonctions hépatiques. Cependant, il est possible que les altérations neurologiques provoquées par l'HE ne soient pas réversibles même si l'atteinte hépatique est corrigée.

Afin de traiter spécifiquement l'HE, les traitements visent à diminuer l'ammoniac. En cas d'épisode d'HE, la ligne de conduite selon les recommandations de l'American Association for the Study of Liver Disease et de l'European Association for the Study of Liver Disease de 2014 (Vilstrup *et al.*, 2014) consiste d'une part à traiter le facteur déclenchant et d'autre part à faire diminuer le taux d'ammoniac. A cet effet, il est recommandé de donner aux patients du lactulose, un disaccharide non absorbable traditionnellement utilisé en cas de constipation, qui permet de réduire le niveau d'ammoniac efficacement. Le lactulose est le traitement standard utilisé depuis les années 1950 et agit d'une part sur le mouvement intestinal de façon à éliminer l'excédent d'ammoniac et d'autre part en créant un environnement dans le tractus digestif réduisant la prolifération des bactéries productrices d'ammoniac.

D'autres traitements sont utilisés ou à l'étude de manière à diminuer le taux d'ammoniac, c'est notamment le cas de l'AST-120, des billes de carbones qui adsorbent l'ammoniac; du sodium phénylacétate et du sodium benzoate qui sont des piègeurs d'ammoniac qui augmentent son excrétion dans les urines; du glycérol phénylbutyrate et de l'ornithine phénylacétate qui transforment l'ammoniac en sel cristallin qui est éliminé dans les urines; du polyéthylène glycol qui améliore la clairance de l'ammoniac. Considérant l'ammoniac comme un produit du microbiote intestinal, des probiotiques et des antibiotiques comme la rifaximine, un antibiotique de la famille de la rifamycine, sont utilisés depuis les années 2000.

Évaluation de l'efficacité de la rifaximine en comparaison du lactulose et de la combinaison des deux traitements pour le traitement de l'encéphalopathie hépatique dans un modèle murin de cholestase hépatique

Introduction

Contexte de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le laboratoire d'hépto-neuro du docteur Christopher Rose, Ph.D., au CRCHUM. Le projet a été réalisé par Grégory Petrazzo, M.Sc., avec l'assistance de Rafael Ochoa-Sanchez, Ph. D., et Mariana Oliveira, M.Sc. Cette étude est réalisée en partenariat avec le laboratoire de biologie médicale du CHUM pour la mesure des marqueurs de la fonction hépatique.

Rationalisation de l'étude

L'HE est un syndrome secondaire des maladies hépatiques qui affecte grandement la qualité de vie des personnes souffrant de cette condition. L'HE est caractérisée par une altération psychique et cognitive qui peuvent entraîner des changements de personnalité et de comportements. Le seul traitement curatif de l'EH consiste à traiter l'étiologie de l'atteinte hépatique et rétablir complètement les fonctions du foie, ultimement cela peut être accompli par une transplantation hépatique. Cependant, certaines données tendent à prouver qu'après une transplantation hépatique et malgré le rétablissement des fonctions hépatiques, il est possible que les conséquences neurologiques soient partiellement non réversibles (Zivkovic S.A., 2013). C'est pourquoi il apparaît de plus en plus nécessaire de traiter efficacement le développement de l'HE même avant la transplantation.

Le lactulose est un disaccharide non absorbable qui est utilisé en clinique depuis les années 1970 pour le traitement de l'HE. Progressivement, le lactulose est devenu le traitement de référence pour l'HE. Étant initialement prescrit comme laxatif, le traitement dans le cadre de

l'HE s'accompagne d'effets secondaires gastro-intestinaux évidents qui sont un inconvénient majeur pour les patients dont l'observance est pauvre. Le mécanisme d'action du lactulose est controversé mais semble nécessiter le métabolisme de la flore entérique. Le lactulose provoque une augmentation de l'incorporation du nitrogène par la fraction bactérienne et une réduction de la dégradation des composés nitrogenés en ammoniac. Ceci résulte dans une diminution de la production d'urée et une augmentation de la clairance de l'ammoniac dans les selles (Weber, 1996).

La rifaximine est un antibiotique très peu absorbable dont le large spectre d'activité est presque exclusivement restreint au tractus digestif. Son utilisation est principalement indiquée pour le soulagement du syndrome de côlon irritable (Pimentel, 2016). En tant qu'antibiotique, la rifaximine a un effet direct sur le microbiote intestinal. Cependant, la rifaximine peut également avoir un mécanisme d'action direct par activation de récepteur PXR qui va induire une dégénération des lipides hépatocellulaires ce qui peut avoir des effets secondaires indésirables sur le foie (Cheng et *al.*, 2012). La rifaximine est également utilisée dans le traitement de l'HE, principalement en concomitance avec le lactulose. Cependant, les données issues de différentes études cliniques sont contradictoires et viennent tantôt supporter, tantôt remettre en cause la pertinence de l'utilisation de la rifaximine.

Une étude a été réalisée en 2010 par l'équipe de Williams P. Forbes (Bass et al, 2010) pour évaluer l'efficacité de la rifaximine dans le traitement de l'HE. Brièvement, tous les patients (n = 299) qui ont été recrutés sont atteints d'une insuffisance hépatique chronique et en rémission d'au moins deux épisodes d'HE au cours des six derniers mois. Deux cohortes ont été constituées en fonction du traitement administré durant les six mois de l'étude soit rifaximine 550 mg deux fois par jour (n = 140) ou un placebo (n = 159). Au cours de l'étude, les patients furent suivis pendant six mois et les critères d'évaluation furent le temps d'occurrence d'un épisode d'HE et le temps d'occurrence de la première hospitalisation en lien avec l'HE. Une donnée centrale résultante de leur étude fut de montrer que l'administration de rifaximine (+ lactulose) comparativement au placebo (+ lactulose) provoque une réduction de l'occurrence du nombre d'épisodes d'HE de 60 %. Étant le traitement standard pour leur condition, l'administration concomitante de lactulose fut autorisée au cours de l'étude, ainsi 91,3 % des sujets ont pris au moins une fois de la rifaximin (+ lactulose) au cours de l'étude. Ceci constitue

la limitation la plus importante de cette étude. En effet, celle-ci ne permet pas déterminer l'effet de la rifaximine seule *per se* car chez plus de neuf patients sur dix les patients prenaient également du lactulose. De ce fait, cette étude compare plutôt l'effet de la rifaximine + lactulose contre le lactulose seul et non l'effet de la rifaximine seule (puisque'il ne serait pas éthique de retirer à des patients leur traitement de référence).

Dans ce contexte, notre laboratoire souhaite mettre à profit son expérience avec le modèle de cholestase hépatique chez le rat pour évaluer les effets de la rifaximine seule en comparaison avec le lactulose ou avec la combinaison des deux traitements. Nous émettons l'hypothèse que ces traitements pris de façon individuelle auront un impact positif sur le taux d'ammoniac et le degré de l'HE évalué à travers les tests comportementaux. Nous émettons également l'hypothèse que la rifaximine prise seule à un effet similaire si ce n'est supérieur au lactulose pour améliorer les paramètres étudiés. Aucune donnée n'étant publiée sur l'efficacité de ces traitements dans notre modèle et dans ces conditions expérimentales, nous ne prendrons pas le parti de considérer le lactulose comme un contrôle positif de l'efficacité des traitements mais nous comparerons l'effet de chaque traitement contre les animaux qui ne reçoivent que le véhicule.

Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la rifaximine seule et du lactulose seul ou en combinaison avec la rifaximine dans un modèle murin de ligature de la voie biliaire (modèle BDL). Plus précisément, tous les traitements seront administrés quotidiennement pendant trois semaines à partir de l'établissement d'une fibrose hépatique avancée. Pour mesurer l'impact de ces traitements dans le cadre de l'HE plusieurs paramètres comportementaux et biologiques seront évalués pour confirmer l'efficacité des traitements.

Modélisation de l'étude

Pour cette étude, cinq groupes ont été établis en fonction des traitements administrés aux animaux (Figure 1). Les cinq groupes définis sont respectivement : SHAM-véhicule, BDL-véhicule, BDL-lactulose, BDL-rifaximine, BDL-lactulose+rifaximine. Brièvement, tous les animaux sont hébergés à l'animalerie du CRCHUM et associés à une chirurgie de ligature de la

voie biliaire (BDL) ou à un simulacre de la chirurgie (SHAM). Les animaux sont suivis pour toute la durée de leur modèle au niveau de leur poids pour la croissance et de leur consommation de nourriture. Trois semaines après, les traitements ou le véhicule sont administrés pendant trois semaines (lactulose 6 mg/kg, rifaximine 50 mg/kg, ou lactulose 6 mg/kg + rifaximine 50 mg/kg). Les doses administrées aux rats sont légèrement supérieures (de 5 à 10 fois supérieures) à celles données aux patients de l'étude de Forbes et *al.*, les animaux étant généralement moins sensibles aux traitements, il est nécessaire de leur administrer des doses plus élevées afin d'observer un effet des traitements (Anroop B. Nair et *al.*, 2016).

Après 10 jours de traitement, des tests comportementaux sont réalisés pour mesurer la locomotion et l'exploration (OFT et NOR), la coordination motrice (Rotarod, activité nocturne), la mémoire et les capacités d'apprentissage (NOR, Rotarod), l'anxiété et la dépression (EPM et NOR) et la peur (NOR, OFT). A la fin de chaque modèle, les animaux sont euthanasiés, un échantillon de sang est prélevé pour mesurer les biomarqueurs hépatiques (ALT, AST, GGT, PAL, bilirubine, albumine et ammoniac), un échantillon de cerveau est utilisé pour mesurer l'œdème cérébral.

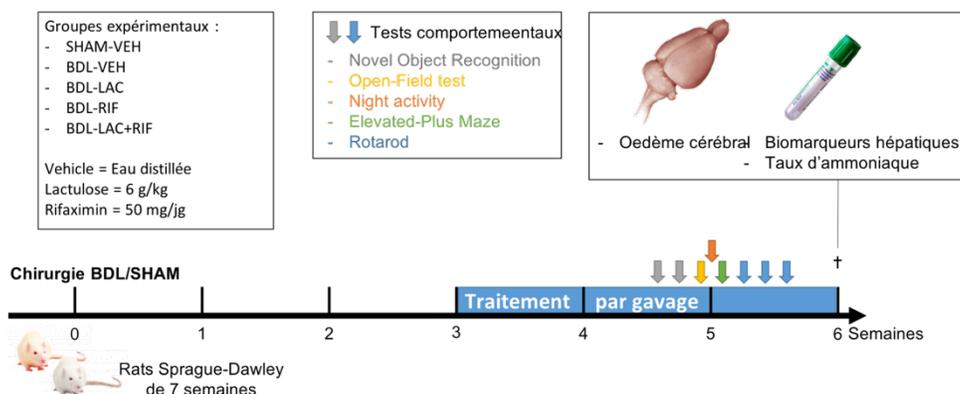


Figure 1. Graphique simplifié du plan d'étude établi.

Tous les animaux ont été séparés en cinq groupes expérimentaux (n = 10 par groupes) pour subir une chirurgie de ligature de la voie biliaire ou le simulacre de chirurgie. Trois semaines après la chirurgie, les animaux reçoivent un des différents traitements jusqu'à la fin du modèle. Dix jours après le début du traitement des tests comportementaux pour évaluer l'état de l'HE sont réalisés. En fin de modèle, tous les animaux sont sacrifiés pour prélever les organes et les fluides biologiques.

Matériels et méthodes

Réactifs et traitements

Le lactulose a été obtenu auprès de Pharmascience (Montréal, QC, # de catalogue DIN02247383), et stocké à température ambiante en accord avec les recommandations du fabricant. La rifaximine a été obtenue auprès de Salix pharmaceuticals (Bridgewater, NJ, # de catalogue 9593702-20002177), et stocké à température ambiante en accord avec les recommandations du fabricant. La rifaximine a été préparée à une concentration de 50 mg/kg dans de l'eau distillée. Le véhicule utilisé pour l'étude est de l'eau distillée.

La solution de rifaximine a été préparée hebdomadairement. Le lactulose et la rifaximine ont été aliquotés dans des tubes falcons de 50 ml pour une utilisation quotidienne. Tous les traitements ont été administrés aux mêmes heures avec une canule de gavage en plastique adaptée sur une seringue de 10 ml. Le lactulose a été administré entre 12h00 et 13h00 tandis que la rifaximine et le véhicule ont été administrés entre 17h00 et 18h00. Les traitements ont été administrés en décalé afin d'éviter que le lactulose n'interfère avec le rifaximine en augmentant le transit intestinal au moment de l'administration de la rifaximine. Le volume de gavage administré à 10 ml/kg est ajusté quotidiennement au poids des animaux.

Modèle animal

Tous les animaux (n = 50) utilisés dans l'étude sont des rats mâles (*Rattus norvegicus*) de souche Sprague-Dawley obtenus auprès de Charles River (Saint-Constant, QC), âgés de sept et huit semaines et pesant entre 230 g et 274 g. Tous les animaux ont été hébergés à l'animalerie du CRCHUM dans des cages conventionnelles solides non stériles avec filtre, deux animaux par cage, avec des conditions d'hébergements rigoureusement contrôlées (température : 20 – 22 °C, humidité : 45 – 60 %, cycle diurne et nocturne de 12 heures). Les animaux sont nourris *ad libitum* avec une nourriture calibrée et standard (Irradiated 2018 Teklad Global 18 % protein rodent diet) obtenue auprès de Envigo Laboratories Inc. (Wyton, UK) et ont un accès *ad libitum* à une valve d'eau filtrée et distillée. Une période d'adaptation de deux jours est observée pour tous les animaux nouvellement arrivés à l'animalerie avant toute manipulation.

Par la suite, tous les animaux ont subi une chirurgie de ligature de la voie biliaire ou un simulacre de cette chirurgie et sont assignés à un des cinq groupes expérimentaux qui correspondent au traitement administré. Les groupes sont définis tels que : SHAM-VEH, BDL-VEH, BDL-LAC, BDL-RIF et BDL-LAC+RIF. Après la troisième semaine de chirurgie, tous les traitements sont initiés. L'évaluation des tests comportementaux est réalisée au cours de la quatrième semaine. Les animaux seront déplacés dans la pièce de comportement 1h avant l'expérience (temps d'habituation) avant de réaliser les tests suivants : Rotarod (J-35, J-36 et J-37), l'Open-Field test (J-33), l'Elevated Plus Maze (J-34), le Novel Object Recognition test (J-31 et J-32) et l'activité nocturne (phase active de 12h, J-34 à J-35 de 18h30 à 06h30). Au moment du sacrifice, d'une part, un échantillon de plasma est prélevé pour mesurer les biomarqueurs hépatiques et l'ammoniac, d'autre part, le cerveau est prélevé pour mesurer dans le cortex frontal l'œdème cérébral.

La consommation de nourriture de toutes les cages est relevée hebdomadairement et ramenée par animal. La croissance des animaux est évaluée en mesurant hebdomadairement le poids de tous les animaux. La composition corporelle (masse grasse, masse sèche, masse hydrique et masse hydrique libre) est mesurée hebdomadairement par résonance magnétique nucléaire et imagerie par résonance magnétique. De plus, les comportements et la condition générale de tous les animaux est soigneusement surveillée pour tout signe de décompensation, cela inclut notamment la démarche, l'activité, l'hydratation, l'aspect du pelage et des yeux, tout signe de léthargie ou d'alopécie. Tout animal présentant une perte de poids de plus de 20 % au cours des trois derniers jours, qui présente un taux de déshydratation sévère ou qui ne réagit à aucun stimulus physique ou vocal sera euthanasié. Tous les protocoles expérimentaux ont été conduits en accord avec les directives du conseil canadien de protection des animaux et approuvés par le comité institutionnel de protection animal du CRCHUM.

Procédures chirurgicales

Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées dans des conditions strictes de stérilité par le docteur Rafael Ochoa-Sanchez pour les chirurgies de ligature de la voie biliaire et par Mariana Oliveira pour les simulacres de chirurgies de ligature de la voie biliaire.

Le jour de la microchirurgie, les animaux sont amenés dans la salle de chirurgie et reçoivent une injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien (carprofène 50 mg/ml, i.p., 5ml/kg) au minimum une heure avant l'intervention. Au moment de l'intervention, les animaux sont endormis et maintenus inconscients par un flux constant d'isoflurane, leur pelage est rasé au niveau abdominal et plusieurs injections d'un anesthésique local (bupivacaïne 2,5 mg/ml dilué au 1:10 en s.c.), jusqu'à un total de 1 ml, sont réalisées au niveau du site chirurgical. Durant toute la procédure, les animaux sont placés sur un coussin chauffant pour prévenir toute hypothermie, chaque intervention dure en moyenne 20 minutes. Une laparotomie médiane de 2 cm est réalisée le long de la ligne blanche, les tissus sous-cutanés, le péritoine et les muscles abdominaux sont écartés. Les intestins sont abaissés de façon à pouvoir parfaitement mobiliser le foie et exposer le canal biliaire commun. Une injection intracholédocienne de 0,5 ml formaline (10 % formaline), préparée extemporanément, est réalisée pour empêcher toute future dilation du canal biliaire résiduel. Le canal biliaire commun est ligaturé par un fil de soie 4-0 en amont et en aval avant d'être sectionné. Après avoir repositionné le foie et les intestins, la muqueuse péritonéale ainsi que la peau sont suturées par un fil de soie 6-0. A la fin de la procédure les animaux sont hébergés dans un incubateur à 37 °C pour le reste de la journée avant de retourner dans leur hébergement à l'animalerie.

Les animaux sont surveillés rigoureusement pendant les cinq jours postopératoires suivants pour tout signe de douleur, perte anormale de poids ou de déshydratation. Durant les trois premiers jours postopératoires les animaux ont reçu une dose quotidienne de carprofène i.p. pour contrôler la douleur. Les animaux reçoivent quotidiennement une supplémentation de nourriture humide et en Ensure[®] Plus (les trois premiers jours seulement) pour les aider à mieux récupérer.

Mesure des biomarqueurs hépatiques

En fin de modèle, les animaux sont systématiquement euthanasiés. Tous les animaux sont alors endormis et maintenus inconscients par un flux continu d'isoflurane. Une laparotomie est réalisée, les organes sont abaissés afin d'exposer le diaphragme qui est alors ouvert pour créer un pneumothorax. Le cœur alors exposé permet de réaliser une ponction cardiaque avec une seringue préhéparinée, 4 à 5 ml de sang total sont collectés, aliquotés en tubes Eppendorf et

centrifugés 15 minutes à 200 G à 4 °C. Après centrifugation, le plasma est collecté dans de nouveaux tubes Eppendorf et instantanément congelé avec de la glace sèche dans une solution d'isobutanol et conservé à – 80 °C avant analyse ou directement analysé (ammoniac par le kit Randox).

Tous les échantillons sont ultérieurement décongelés et envoyés au laboratoire de biologie médicale du CHUM pour mesurer les enzymes hépatiques ALT, AST, GGT, PAL mais également les produits du métabolisme hépatique bilirubine et albumine.

Mesure de l'ammoniac plasmatique

Un échantillon de plasma est également décongelé et utilisé pour mesurer le taux d'ammoniac plasmatique. Le taux d'ammoniac plasmatique est mesuré avec le kit obtenu auprès de Randox Laboratories (Mississauga, ON). Échantillons fraîchement prélevés, blanc (eau ultra pure) et solution standard d'ammoniac sont traités de la même façon, 30 µl de chaque sont déposés dans une plaque 96 puits. Tous les échantillons sont réalisés en triplicata. 300 µl de réactif tampon contenant de l' α -cétoglutarate et du NADPH sont ajoutés aux puits. Après 5 minutes à température ambiante, l'absorbance de chaque puits est mesurée dans un lecteur de microplaque à une densité optique de 340 nm. La réaction enzymatique est alors déclenchée en ajoutant 3 µl de GLDH. La plaque est incubée à nouveau 5 minutes à température ambiante et l'absorbance de chaque puits est mesurée dans un lecteur de microplaque à une densité optique de 340 nm. La concentration en ammoniac est calculée en divisant la valeur de l'échantillon soustrait de la valeur du blanc par la valeur du standard soustrait de la valeur du blanc et multiplié par la concentration du standard.

Mesure de l'œdème cérébral

Le jour du sacrifice, après le prélèvement sanguin, les animaux sont décapités, le cerveau est immédiatement extrait pour être disséqué. Plusieurs échantillons radiaux de 1 à 2 mm du cortex frontal droit sont réalisés dans la substance grise en prenant soin de retirer les vaisseaux visibles. L'œdème cérébral est alors mesuré comme décrit précédemment (Marmarou et *al*, 1978).

Brièvement, dans un premier temps, une gamme d'étalonnage de solution de KCl est préparée telle que 3,40 mg/ml, 4,70 mg/ml, 5,34 mg/ml et 5,99 mg/ml qui ont des densités respectivement de 1,025, 1,030, 1,040 et 1,045. Dans un second temps, deux solutions correspondant à un mélange de monobromobenzène et de kérosène sont préparées pour des densités de 0,9750 et 1,0650. Ces deux solutions sont installées de façon à que la solution la plus dense se déverse lentement sur la paroi d'une éprouvette graduée et que la solution la moins dense se déverse dans la solution la plus dense. Ceci crée un gradient de densité où le fond de l'éprouvette a une densité proche de 0.9750 et le haut de l'éprouvette a une densité proche de 1,0650. Une goutte de chaque concentration de la gamme d'étalonnage est alors déposée à la surface de la solution de gradients de densité. En fonction de leur concentration et de leur densité, les gouttes de la gamme d'étalonnage vont couler plus ou moins loin dans l'éprouvette. Les échantillons de cortex cérébral sont alors déposés à leur tour à la surface de la solution de gradients de densité. En comparant les échantillons avec la gamme d'étalonnage, il est alors possible d'obtenir le pourcentage de gramme d'eau par gramme de tissu. Cette valeur reflète, le contenu en eau d'un tissu et dans le contexte d'un échantillon de cerveau cette valeur permet de mesurer l'œdème cérébral.

Tests comportementaux (Rotarod, Elevated Plus Maze, Open-Field test, Novel Object Recognition, activité nocturne)

Plusieurs tests comportementaux ont été réalisés au cours de la quatrième semaine de l'étude. Tous les animaux sont transférés dans la salle de comportements une heure avant le début de la procédure de test pour les habituer au changement d'environnements et diminuer leur stress. Afin de s'assurer de la validité des tests, des systèmes de contrôle des capacités de réponses et de participation des animaux sont mis en place. En bref, l'opérateur des tests comportementaux s'assure visuellement de la coopération des animaux lors des tests. Dans cette étude, aucun animal n'a été exclu des analyses.

Le test Rotarod qui évalue la coordination motrice, la mémoire et l'apprentissage a été réalisé à J+35, J+36 et J+37 après chirurgie. Le Rotarod a été réalisé avec les instruments de la compagnie (Omnitech Electronics Inc.) et le logiciel Fusion Software. Les animaux sont dans un premier temps habitués à tenir, dos à l'expérimentateur, sur les cylindres tournants pendant

cinq minutes, les animaux qui tombent, qui sautent du cylindre ou qui se retournent sont immédiatement replacés. Lors de la série de tests, réalisés six fois, les animaux sont placés sur le cylindre tournant, dos à l'expérimentateur. Le cylindre se met alors en mouvement avec une vitesse croissante. Les animaux avancent sur le cylindre à mesure que celui-ci tourne sur lui-même et le temps de latence jusqu'à la chute de l'animal est relevé. Les animaux qui se retournent dans les trente premières secondes sont immédiatement replacés de même que les animaux qui se laissent tomber dans les dix premières secondes. Un essai est exclu si un animal se retourne avant de tomber. La moyenne du temps passé sur le cylindre en mouvement avant la chute des trois meilleurs essais est conservée pour les analyses.

Le test d'Open-Field qui mesure la locomotion, l'exploration et la sensation de peur est réalisé le J+33 après chirurgie. Les animaux sont dans un premier temps placés individuellement au même endroit dans l'enceinte du test (une enceinte aux parois noires de 90 cm par 90 cm), et sont laissés libres d'explorer leur environnement pendant cinq minutes). En temps normal, les animaux vont naturellement venir explorer leur environnement, les sujets moribonds sont euthanasiés préventivement car de tels animaux sont en souffrance et ne finissent pas généralement pas l'étude. Leur condition reflète alors plus la décompensation de leur cirrhose qu'un quelconque effet de traitement. Suivant la période d'habituation, les déplacements des animaux sont relevés avec un système de suivi par caméra guidé par le logiciel (SMART software). Dans l'enceinte trois zones sont définies telles que le centre correspond à la zone centrale de l'enceinte et est égale à 50 % de la paroi de l'enceinte. La partie entre la paroi et la zone centrale est divisée en deux parties égales, une partie externe et une partie interne. Grâce au système de suivi, le temps passé dans chaque zone est relevé.

Le test d'Elevated Plus Maze qui mesure l'anxiété et la dépression est réalisé le J+34 après la chirurgie. Les animaux sont dans un premier temps placés individuellement au même endroit dans le dispositif de test qui est une plateforme en forme de croix élevée à 90 cm du sol dont deux bras se faisant face sont encerclés par des parois noires, la partie centrale est ouverte sur les deux bras se faisant face et donnant sur le vide. En temps normal, les animaux vont naturellement venir explorer leur environnement, les sujets moribonds sont euthanasiés préventivement car de tels animaux sont en souffrance et ne finissent pas généralement pas l'étude. Leur condition reflète alors plus la décompensation de leur cirrhose qu'un quelconque

effet de traitement. Si les animaux sont jugés trop souffrants pour réaliser la tâche, ceux-ci sont sacrifiés pour des raisons éthiques sur la base du fait qu'ils ne survivront probablement pas jusqu'à la fin du modèle. L'exclusion des animaux atteste également de leur manque de motivation, cependant aucun groupe expérimental ne comportait un nombre significativement plus élevé d'animaux peu motivés. Suivant la période d'habituation, les déplacements des animaux sont relevés avec un système de suivi par caméra guidé par le logiciel (SMART software). Dans l'enceinte trois zones sont définies telles que le centre correspond à la zone centrale, bras ouvert qui correspond aux bras donnant sur le vide et bras fermé qui correspond aux bras encerclés par les parois. Grâce au système de suivi, le temps passé dans chaque zone est relevé.

Le test de Novel Object Recognition qui mesure la locomotion, l'exploration, l'anxiété, la dépression et la sensation de peur est réalisé à J+31 et J+32 après la chirurgie. Les animaux sont dans un premier temps placés individuellement au même endroit dans l'enceinte du test (une enceinte aux parois noires de 30 cm par 40 cm), et sont laissés libres d'explorer leur environnement pendant cinq minutes. Si les animaux sont jugés trop souffrants pour réaliser la tâche, ceux-ci sont sacrifiés pour des raisons éthiques sur la base du fait qu'ils ne survivront probablement pas jusqu'à la fin du modèle. L'exclusion des animaux atteste également de leur manque de motivation, cependant aucun groupe expérimental ne comportait un nombre significativement plus élevé d'animaux peu motivés. Dans un premier temps, deux objets identiques sont placés dans l'enceinte (canard en plastique), les animaux sont alors placés dans l'enceinte au même endroit et autorisés à explorer les deux objets. Les animaux qui n'explorent pas les objets sont autorisés à explorer cinq minutes supplémentaires. En temps normal, les animaux vont naturellement venir explorer leur environnement, les sujets moribonds sont euthanasiés préventivement car de tels animaux sont en souffrance et ne finissent pas généralement pas l'étude. Leur condition reflète alors plus la décompensation de leur cirrhose qu'un quelconque effet de traitement. Dans un second temps, une heure après et 24 heures après, les animaux sont placés de nouveau dans l'enceinte avec un des objets qui est substitué par un objet différent (jouet en plastique). Toutes les phases (exploration, habituation et test) sont enregistrées sur caméra. Le temps d'exploration de chaque objet est alors relevé.

L'activité nocturne qui mesure la coordination motrice est évaluée dans la nuit de J+34 à J+35 (phase active de douze heures de 18h30 à 6h30) après la chirurgie dans des cages métaboliques assistées pour les mesures par logiciel Fusion Software. Tous les animaux sont placés individuellement dans des cages métaboliques au moins une heure avant le début du test dans une pièce à environnement contrôlé. Les cages sont transparentes avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture positionné sur l'extérieur de la cage pour lesquels les animaux doivent se cambrier pour y accéder. Des capteurs permettent de mesurer les déplacements horizontaux et verticaux de chaque animal durant la durée du test.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism GraphPad 8 pour Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Une différence significative a été systématiquement reportée pour $p < 0,05$.

Les analyses de survie sont réalisées par comparaison des courbes de survie et test de Log-rank de Mantel et Cox. Quand une différence significative est observée, un test de comparaison multiple adapté de la méthode Bonferroni est réalisé.

Les analyses de croissance mesurant le poids, de consommation de nourriture, d'évaluation de la masse grasseuse, de la masse sèche, de la masse hydrique totale et libre ont été réalisées par comparaison des courbes de croissance après régression linéaire par une analyse One-Way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH comme groupe contrôle pour tous les groupes et BDL-VEH comme groupe contrôle pour les groupes BDL traités. Les résultats sont exprimés avec respectivement #, ##, ### vs SHAM-VEH et ¹; ¹¹; ¹¹¹ vs BDL-LAC ou ²; ²²; ²²² vs BDL-RIF ou ³; ³³; ³³³ vs BDL-LAC+RIF pour $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$. Avant trois semaines, les deux groupes SHAM et BDL sont comparés par une analyse de t-test multiple. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec respectivement *, **, *** vs SHAM-VEH pour $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$. Après trois semaines, les groupes correspondant aux différents traitements sont comparés par une analyse Two-Way ANOVA à effets mixtes et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH comme groupe contrôle pour tous les groupes et BDL-VEH comme groupe contrôle pour les groupes BDL traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec respectivement *, **, *** vs-

SHAM-VEH, la couleur du marqueur indiquant le groupe qui est comparé, et ^a ; ^{aa}, ^{aaa} vs BDL-LAC, ^b ; ^{bb}, ^{bbb} vs BDL-RIF et ^c ; ^{cc}, ^{ccc} vs BDL-LAC+RIF pour $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

Les biomarqueurs hépatiques (albumine, bilirubine totale, phosphatases alcalines, GGT, ALT, AST) et l'ammoniac sont analysés par une analyse One-Way ANOVA avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec respectivement *, **, *** vs SHAM-VEH et ^a ; ^{aa}, ^{aaa} vs BDL-LAC, ^b ; ^{bb}, ^{bbb} vs BDL-RIF et ^c ; ^{cc}, ^{ccc} vs BDL-LAC+RIF pour $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

L'œdème cérébral a été analysé par une analyse One-Way ANOVA avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec respectivement *, **, *** vs SHAM-VEH et ^a ; ^{aa}, ^{aaa} vs BDL-LAC, ^b ; ^{bb}, ^{bbb} vs BDL-RIF et ^c ; ^{cc}, ^{ccc} vs BDL-LAC+RIF pour $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

Les analyses comportementales ont été réalisées par Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3. Pour le Rotarod, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec respectivement *, **, *** pour la mesure de la coordination motrice (entre les groupes dans la même journée) et #, ##, ### pour la capacité d'apprentissage (chaque groupe au cours du temps.) pour $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

L'analyse des points aberrants a été réalisée par méthode ROUT, $Q = 10 \%$. Les points identifiés comme aberrants sont systématiquement retirés de l'analyse.

Résultats

Aucune différence significative de mortalité n'a pu être observée entre les différents traitements

L'analyse de la survie des animaux dans tous les groupes expérimentaux (SHAM, BDL et les différents traitements) a été réalisée (Figure 2).

Une mortalité anormale des animaux SHAM et BDL a été observée dans la période de récupération post-chirurgie pour des raisons indéterminées mais qui ne sont pas liées au modèle en lui-même. Les animaux ayant expérimenté des complications postopératoires (ouvertures des sutures) dans les sept premiers jours postopératoires ont été euthanasiés pour des raisons éthiques. Ces animaux sont exclus des analyses suivantes car ne reflétant pas l'impact du modèle et ne permettant pas de mesurer l'impact des traitements. Trois semaines après les chirurgies SHAM ou BDL, les animaux ont été aléatoirement attribués à un traitement : véhicule, lactulose, rifaximin, lactulose et rifaximin. Un animal SHAM fut exclu de l'étude car il fut attribué à un traitement au lieu du véhicule. Avec l'avancement de l'injure hépatique suite à la ligature des voies biliaires, les premiers animaux montrant des signes de décompensation sont euthanasiés à partir de la 5^{ème} semaine (J+34) post-chirurgie. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents traitements. Aucun animal SHAM n'a été perdu durant l'étude après la période post-chirurgie. Aucun des traitements n'améliore la survie des différentes cohortes d'animaux quand on compare les survies des animaux BDL-VEH avec les animaux traités. Bien que le lactulose soit le traitement standard pour les patients atteints d'HE, nous n'avons jamais testé ce composé dans notre modèle, nous testerons donc les différents traitements contre les animaux ne recevant que le véhicule.

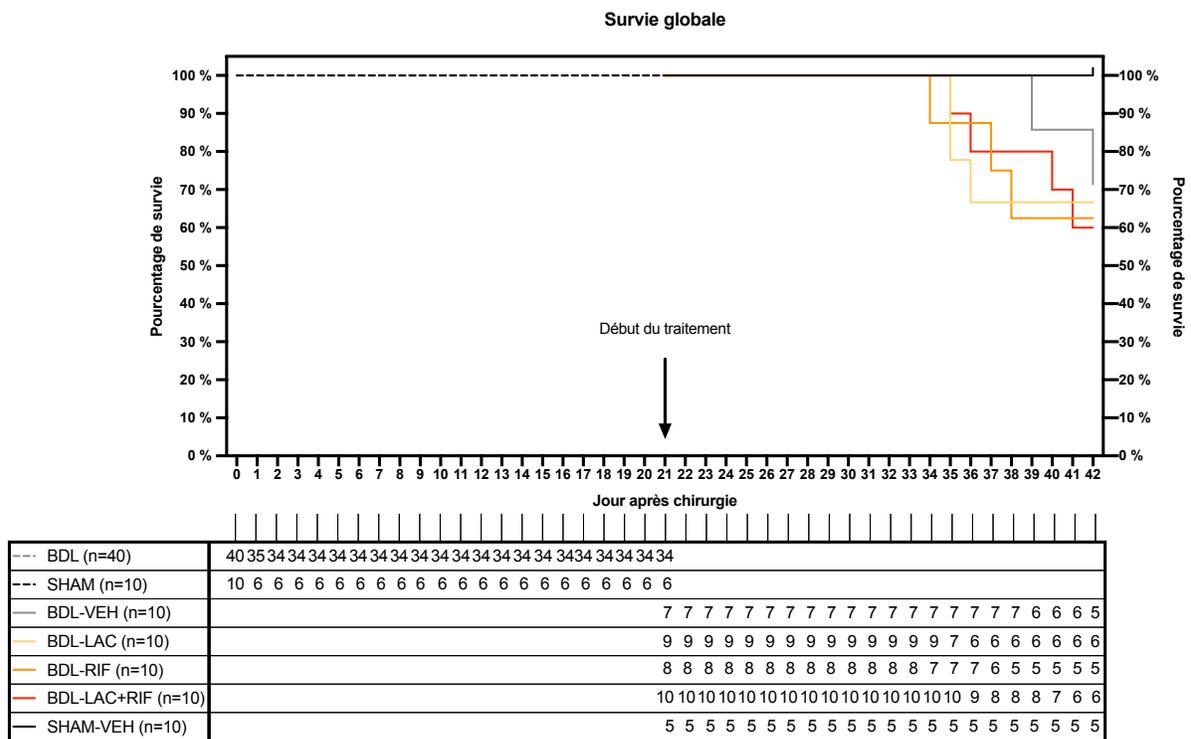


Figure 2. Analyse de survie dans les différents groupes expérimentaux.

Comparaison des courbes de survie dans les différents groupes expérimentaux par test de Log-rank de Mantel et Cox avec $\text{Chi}^2 = 3,018$, $p = 0,5548$.

Les différents groupes montrent une croissance globale et une consommation de nourriture globale normales et indifférenciées entre les animaux BDL

La croissance des animaux a été évaluée en relevant hebdomadairement le poids des animaux dans tous les groupes expérimentaux (SHAM, BDL et les différents traitements) (Figure 3).

Comparativement aux animaux BDL, les animaux SHAM qui n'ont pas eu de complication postopératoire ont une tendance à récupérer plus rapidement après la chirurgie de ligature de la voie biliaire que leurs congénères BDL. L'analyse par régression linéaire des courbes de croissance globale montre que les animaux BDL-LAC ont une croissance réduite comparativement aux animaux SHAM-VEH. Contrairement aux autres traitements, le lactulose agit comme laxatif. Le Lactulose n'a pas d'effet sur la croissance des rats naïfs (Baskaran B., 2001). Cependant, en plus d'augmenter le transit intestinal, le fait que les animaux BDL aient une absorption intestinale diminuée peut expliquer cette différence de croissance. L'absence de différence significative dans les autres groupes d'animaux BDL suggère que ces derniers ont une croissance sensiblement équivalente aux animaux SHAM mais avec un délai qui s'établit depuis la deuxième semaine postopératoire. Seul le groupe BDL-LAC montre une réelle différence significative en comparaison aux animaux SHAM aux semaines trois à semaine six. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents traitements dans les animaux BDL suggérant qu'aucun traitement n'impacte la croissance des animaux.

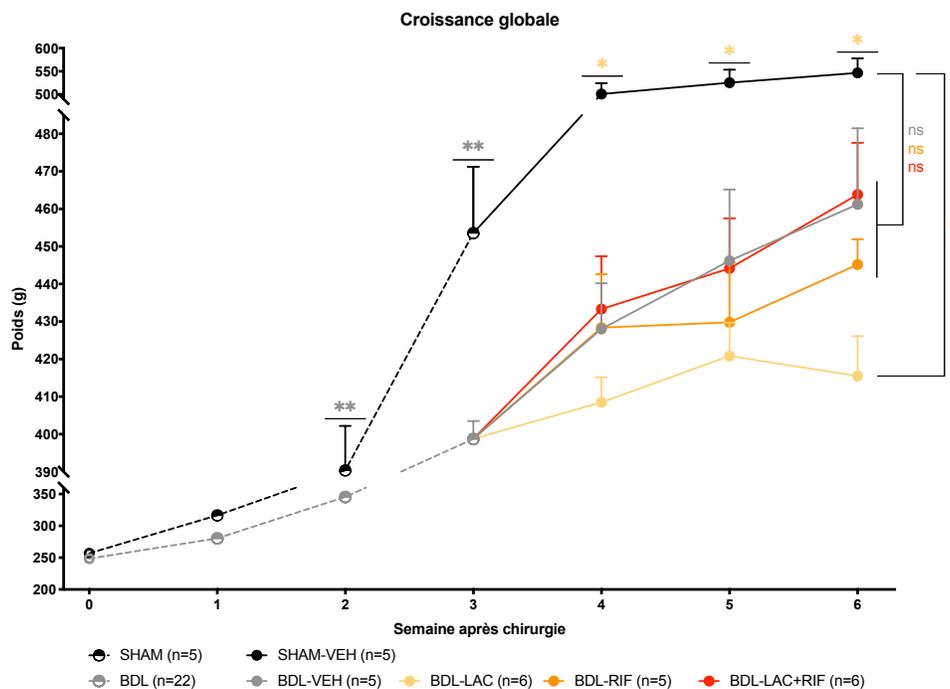


Figure 3. Croissance globale dans les différents groupes de traitements.

Comparaison des courbes de croissance après régression linéaire par une analyse One-Way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (#) comme groupe contrôle pour tous les groupes (la couleur du marqueur # indique le groupe qui est comparé). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec # $p < 0,05$. Avant trois semaines, les deux groupes SHAM et BDL sont comparés par une analyse t-test multiple. Après trois semaines, les groupes correspondant aux différents traitements sont comparés par une analyse Two-Way ANOVA à effets mixtes et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (*) comme groupe contrôle pour tous les groupes (la couleur du marqueur * indique le groupe qui est comparé). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * pour $p < 0,05$ et ** pour $p < 0,01$.

La consommation de nourritures dans tous les groupes expérimentaux (SHAM, BDL et les différents traitements) a été relevée toutes les semaines (Figure 4).

L'appétit des animaux SHAM est plus important à la fin de la première semaine comparativement aux animaux BDL ce qui est en adéquation avec la plus grande difficulté à récupérer pour les animaux BDL après la chirurgie. Par la suite, la consommation de nourriture entre les animaux SHAM et BDL ne montre pas de différence significative bien qu'une différence de poids existe (Figure 3). Les animaux BDL n'excrétant pas de bile dans le tractus digestif, il est possible qu'une malabsorption des lipides explique la différence de prise de poids entre animaux SHAM et BDL. L'analyse par régression linéaire des courbes de croissance globale montre que les animaux BDL-LAC+RIF perdent progressivement leur appétit comparativement aux animaux SHAM-VEH. Ces animaux étant traités par gavage deux fois par jour il est possible que cela influence leur consommation de nourriture. L'absence de différence significative dans les autres groupes d'animaux BDL suggère que ces derniers ont un appétit sensiblement équivalent aux animaux SHAM. Bien que les animaux BDL semblent avoir un rebond d'appétit entre la semaine cinq et six, il n'aurait pas été possible de poursuivre le modèle après six semaines car d'après les données de survie (Figure 2), la plupart des animaux auraient succombé à la décompensation de leur cirrhose.

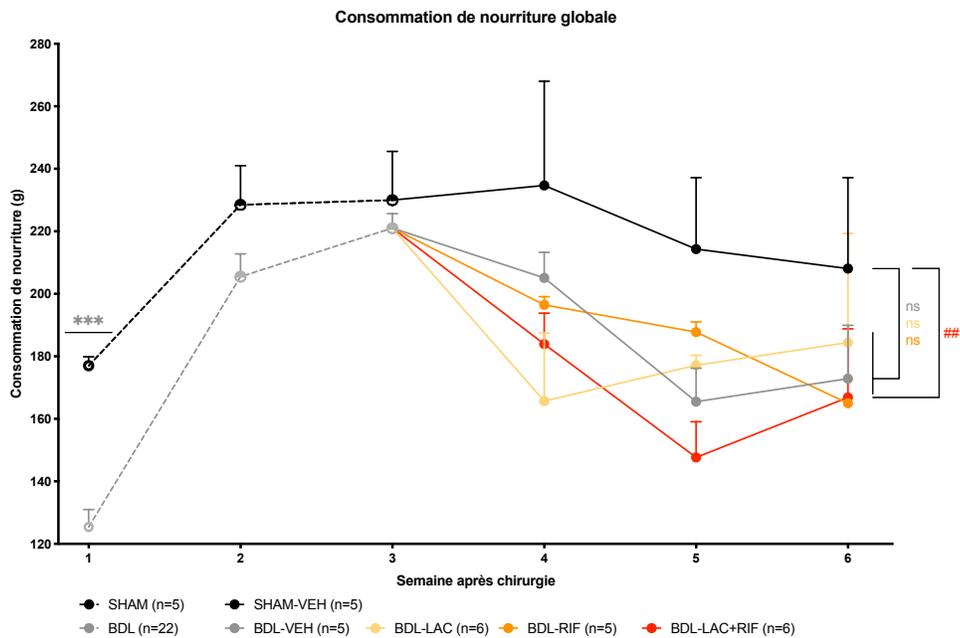


Figure 4. Consommation de nourriture globale dans les différents groupes de traitement.

Comparaison des courbes de croissance après régression linéaire par une analyse One-Way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (#) comme groupe contrôle pour tous les groupes (la couleur du marqueur # indique le groupe qui est comparé). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec ## (vs SHAM-VEH) $p < 0,01$. Avant trois semaines, les deux groupes SHAM et BDL sont comparés par une analyse t-test multiple. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec *** pour $p < 0,001$.

Afin de mieux définir si les différences de poids peuvent s'expliquer par une diminution de la masse grasse, de la masse musculaire ou par une perte d'hydratation, différents paramètres tels que la masse grasse (Figure 5a), la masse sèche (Figure 5b), le contenu en eau totale (Figure 5c) et en eau libre (Figure 5d) a été mesuré par résonance magnétique nucléaire (ÉchoMRI).

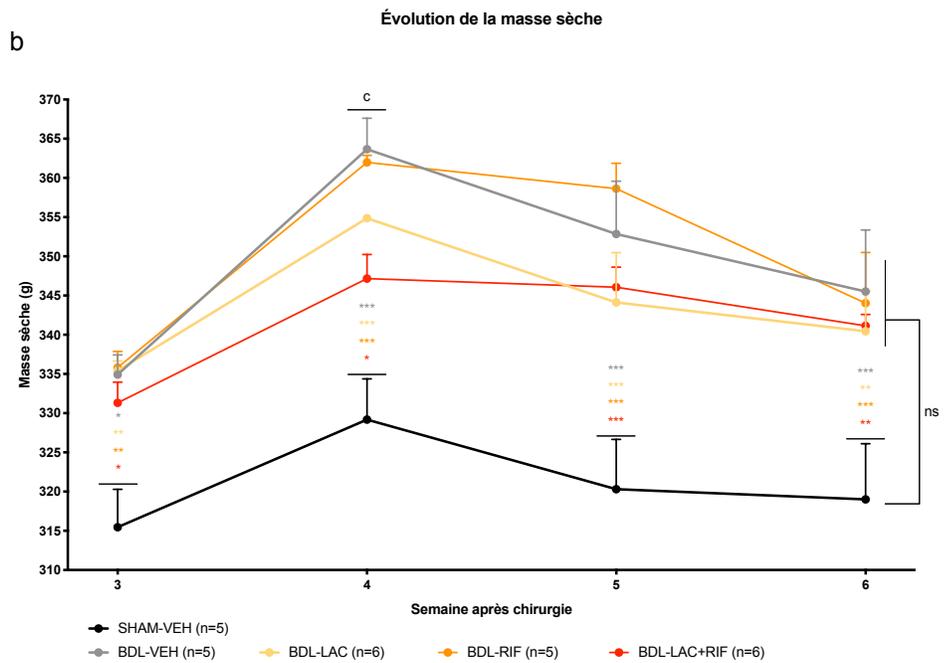
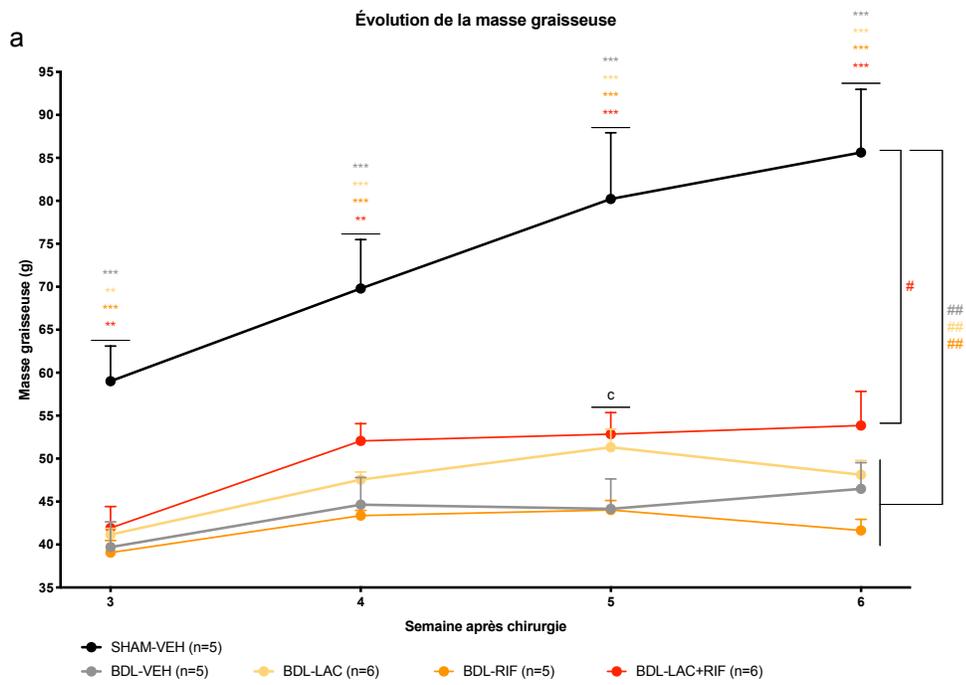
Le taux de masse grasseuse est constamment et significativement plus élevé dans les SHAM que dans les BDL (Figure 5a). L'analyse par régression linéaire des courbes de la masse grasseuse montre que les animaux BDL ne sont pas capables de prendre de gras, ce qui va dans le sens d'une incapacité à absorber les lipides du bol alimentaire voire une incapacité à les stocker. Aucune différence significative n'a été observée entre les animaux BDL dans la tendance à prendre du gras. A la semaine cinq, les animaux BDL-LAC+RIF ont une masse grasseuse plus importante que les animaux BDL-VEH. Il est probable qu'avec un nombre d'animaux plus élevés dans les différents groupes, cette différence entre BDL-LAC+RIF et BDL-VEH n'existerait plus. Le taux de masse grasseuse plus faible chez les rats BDL correspond bien aux observations macroscopiques lors de la dissection le jour du sacrifice des animaux.

Inversement à la masse grasseuse, la masse maigre (qui comprend toutes les parties du corps contenant de l'eau excluant les éléments composés de gras, de minéraux osseux, les poils et les griffes) est constamment et significativement plus faible dans les animaux SHAM que les animaux BDL (figure 5b). Nous nous serions attendus à voir une masse maigre plus faible chez les animaux BDL avec la perte musculaire associée à la cirrhose, cependant ce résultat peut s'expliquer par la présence d'ascites qui sera comptée dans la masse maigre. L'analyse par régression linéaire des courbes de la masse maigre ne montre aucune différence entre les différents groupes expérimentaux. Les animaux BDL-LAC+RIF montre à la semaine quatre une différence significative avec les animaux BDL-VEH, il est probable qu'avec un nombre d'animaux plus élevés dans les différents groupes cette différence soit mitigée voir absente.

La masse hydrique totale des animaux SHAM est constamment et significativement plus élevée que celle des animaux BDL (Figure 5c). A l'exception de la période postopératoire et de la dernière semaine du modèle, les animaux BDL ne montraient pas de signes évidents de déshydratation, un paramètre surveillé quotidiennement. L'analyse par régression linéaire des courbes de la masse hydrique totale montre que les animaux SHAM ont un contenu hydrique

total qui augmente au cours du temps alors que le taux des animaux BDL stagne. Ceci est compatible avec la croissance des animaux SHAM. Le fait que la masse hydrique totale n'augmente pas dans les animaux BDL peut s'expliquer par une forte polyurie chez ces animaux dont les cages devaient être changées plus régulièrement. De la même façon que pour la masse grasseuse, à la semaine cinq, les animaux BDL-LAC+RIF ont une masse hydrique totale plus importante que les animaux BDL-VEH. Il est probable qu'avec un nombre d'animaux plus élevés dans les différents groupes cette différence soit mitigée voir absente.

La masse hydrique libre est constamment et significativement plus faible chez les animaux SHAM que chez les animaux BDL (Figure 5d). L'analyse par régression linéaire des courbes de la masse hydrique libre montre que les animaux SHAM ont un contenu hydrique libre qui décroît au cours du temps alors que le taux des animaux BDL augmente, notamment lors de la dernière semaine du modèle. Ce taux de masse hydrique libre dans les animaux semble être dû à la présence d'ascite qui s'accumule au cours des semaines dans l'abdomen des animaux. De plus, un taux élevé de masse hydrique libre fut observé dans les animaux les plus faibles et en décompensation. A la semaine cinq, les animaux BDL-LAC+RIF ont une masse hydrique libre moins importante que les animaux BDL-VEH, il est probable qu'avec un nombre d'animaux plus élevés dans les différents groupes cette différence soit mitigée voir absente.



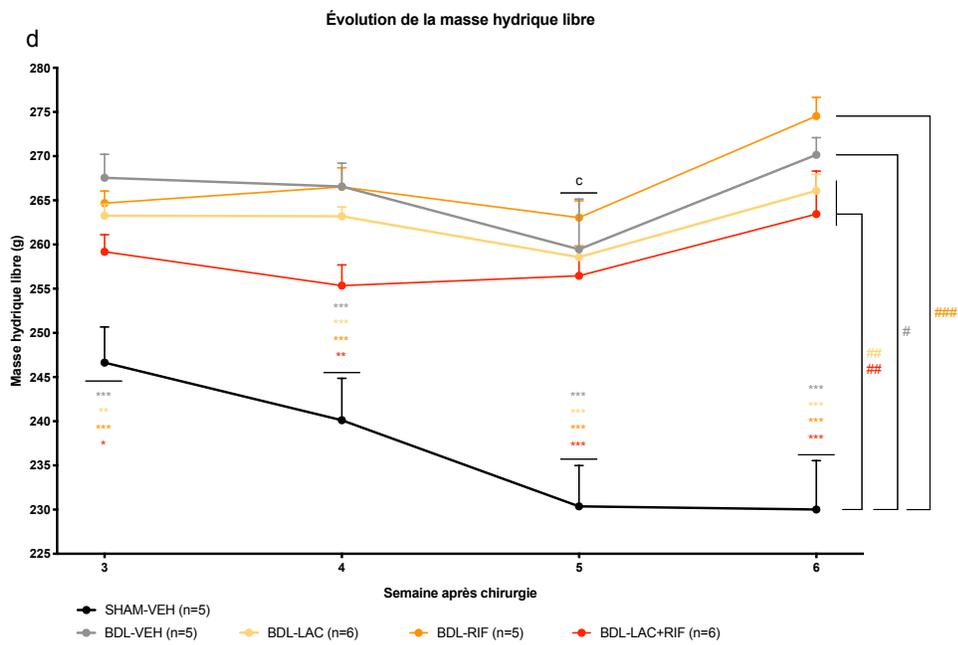
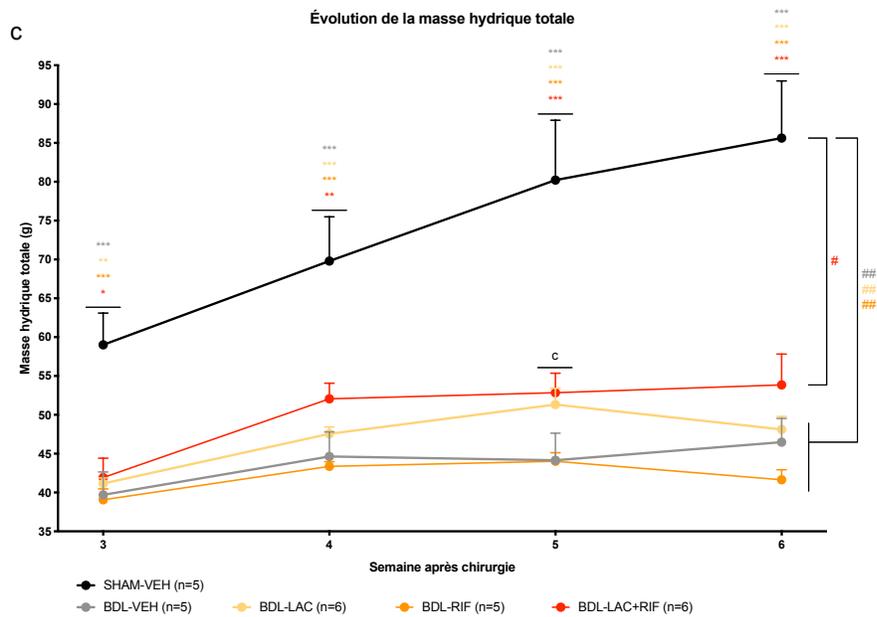


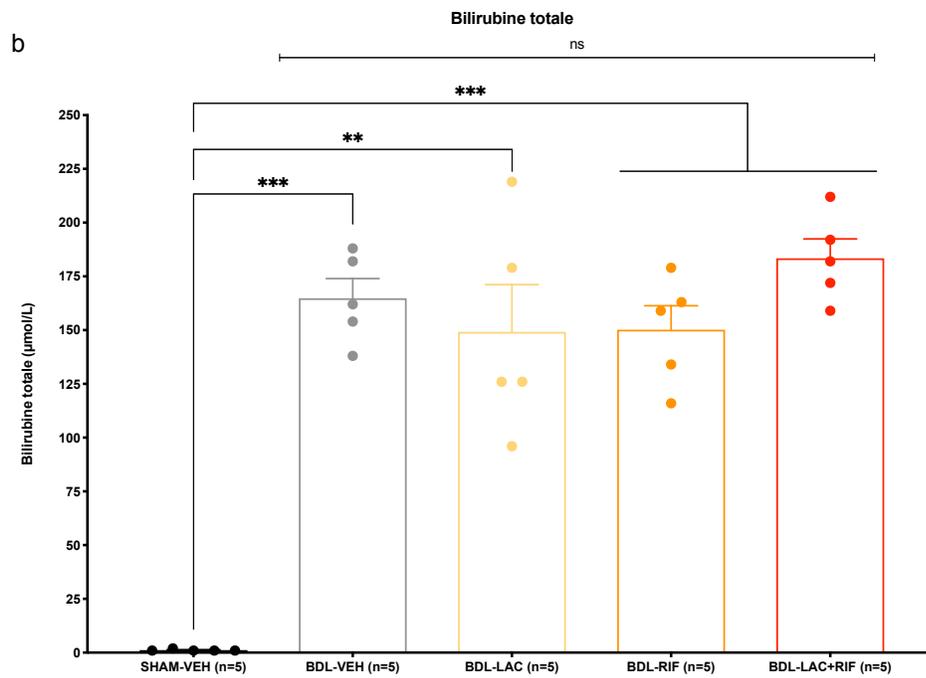
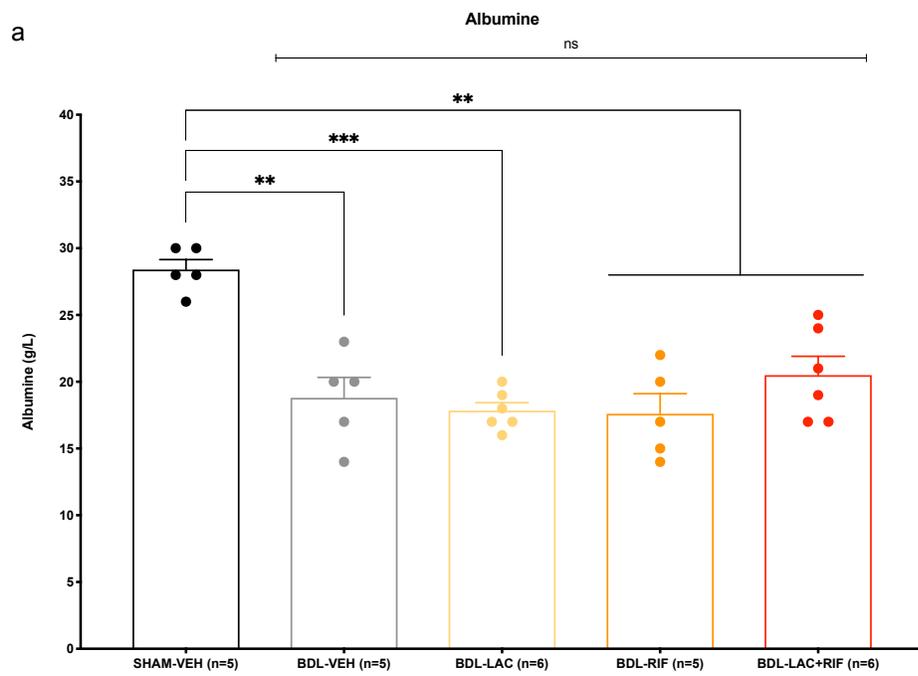
Figure 5. Composition corporelle en masse grasseuse, masse maigre, masse hydrique totale et libre dans l'ensemble de la cohorte.

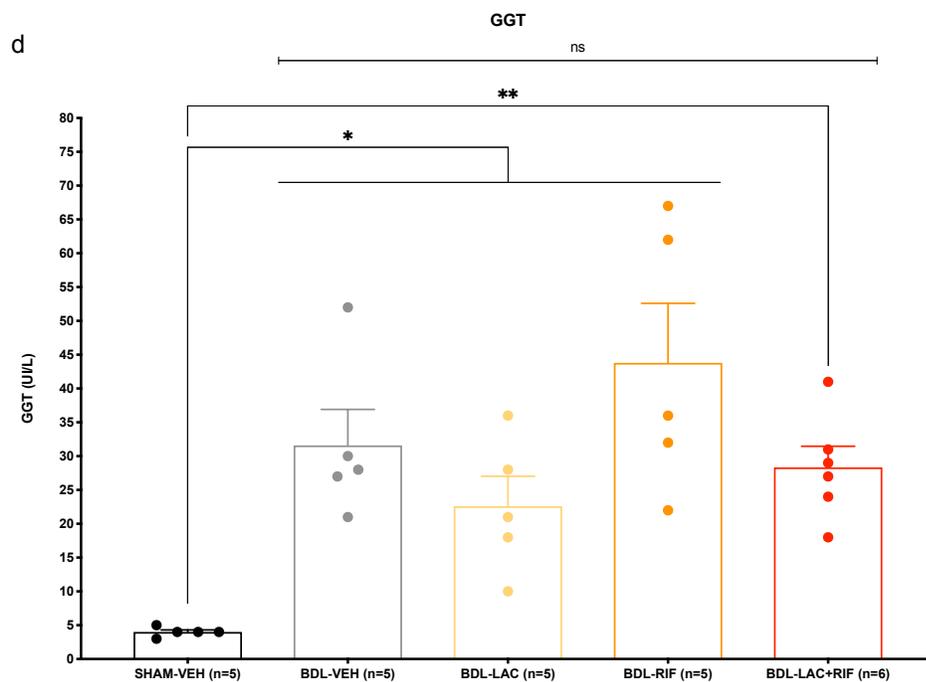
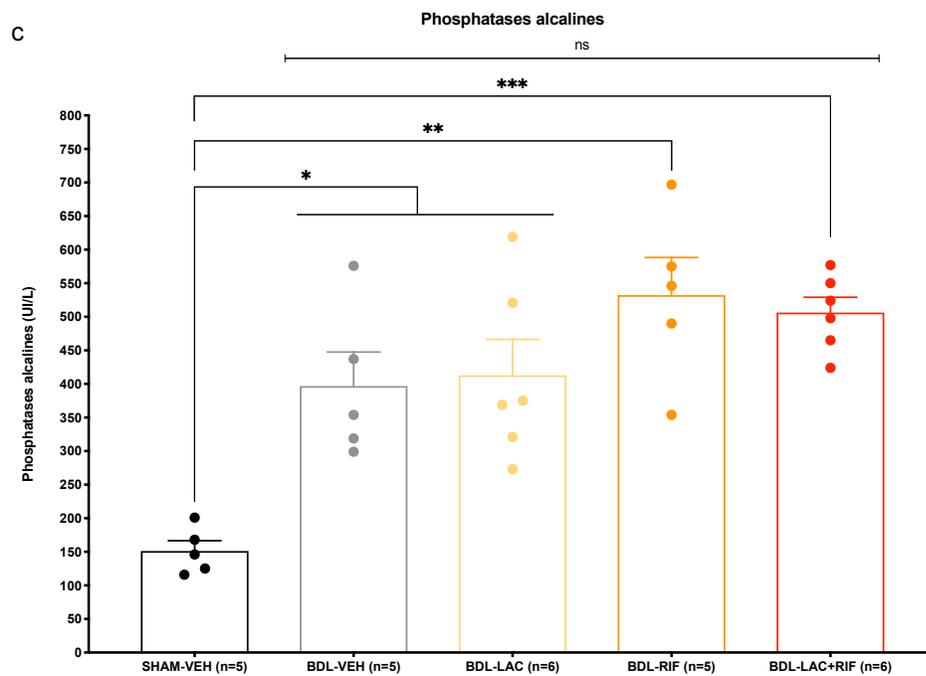
Tous les paramètres ont été analysés par une a. Composition en masse grasseuse. b. Composition en masse maigre. c. Composition en masse hydrique totale. d. Composition en masse hydrique libre. Comparaison des courbes de croissance après régression linéaire par une analyse One-Way ANOVA et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (#) comme groupe contrôle pour tous les groupes (la couleur du marqueur # indique le groupe qui est comparé). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec # pour $p < 0,05$; ## pour $p < 0,01$; ### pour $p < 0,001$. En parallèle, les groupes correspondant aux différents traitements sont comparés par une analyse Two-Way ANOVA à effets mixtes et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (*) comme groupe contrôle pour tous les groupes (la couleur du marqueur * indique le groupe qui est comparé) ou avec BDL-VEH comme groupe contrôle pour comparer les différents traitements dans les groupes BDL (^c vs BDL-LAC+RIF). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec ^c pour $p < 0,05$; ** pour $p < 0,01$; *** pour $p < 0,001$.

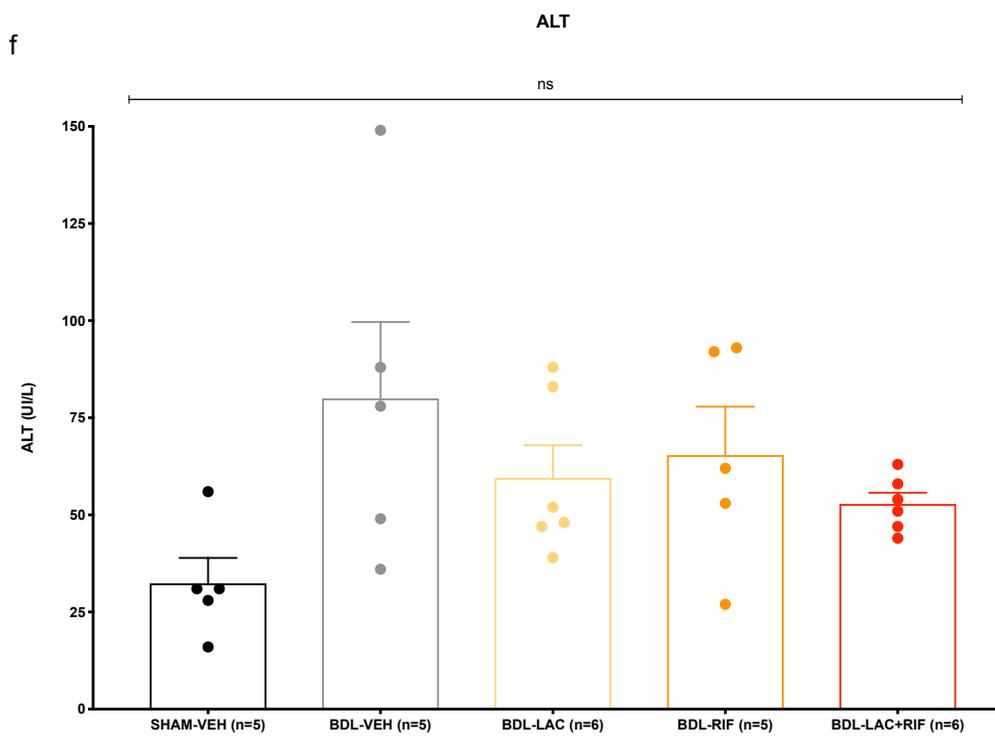
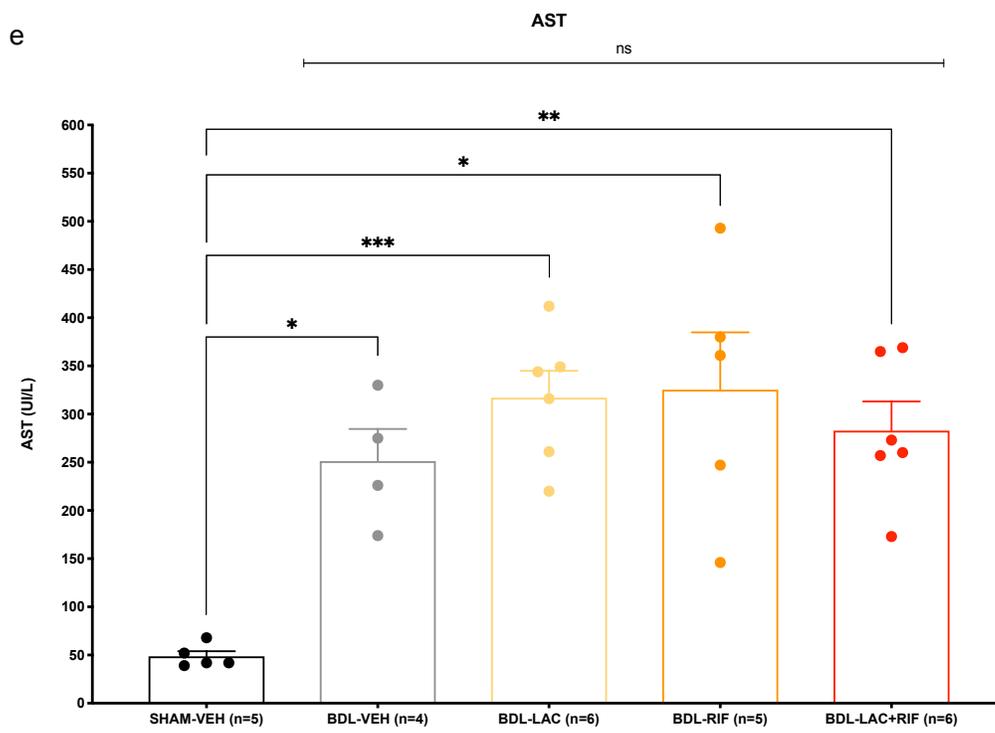
Les biomarqueurs de la fonction hépatique ne montrent pas d'amélioration significative apportée par les différents traitements

Les paramètres biologiques de la fonction hépatiques ainsi que l'ammoniac ont été mesurés à la fin du modèle, soit six semaines après la chirurgie. (Figure 6).

L'albumine (Figure 6a) est diminuée dans tous les groupes BDL comparativement aux animaux SHAM. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents groupes d'animaux BDL. La mesure de la bilirubine totale (Figure 6b), de la GGT (Figure 6d), de l'AST (Figure 6f) et des phosphatases alcalines (Figure 6c) montre des taux augmentés dans les animaux BDL comparativement aux animaux SHAM sans différence significative dans les traitements. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes d'animaux pour l'ALT (Figure 6e) bien que le taux d'ALT dans les animaux BDL soient légèrement plus élevé comparativement aux animaux SHAM. Le taux d'ammoniac est une mesure particulièrement pertinente pour notre modèle d'HE cependant c'est également un paramètre extrêmement sensible à mesurer. A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes pour mesurer le taux d'ammoniac dans le plasma des animaux : une mesure avec un kit commercial de la compagnie Randox (Figure 6g) et une analyse au laboratoire de biologie du CHUM de Montréal (Figure 6h). Le kit randox n'a permis de mettre en évidence qu'une tendance à l'augmentation entre les groupes SHAM-VEH et BDL-VEH ($p=0,0666$), il est probable qu'avec un nombre d'animaux plus élevé cette différence deviendrait significative. Les animaux BDL traités ont un taux d'ammoniac plus élevé que les animaux SHAM. Aucune différence n'a pu être observée entre les animaux non traités et les animaux traités. Il est possible que les conditions de mesure et de prétraitement des échantillons doivent être affinées pour assurer des résultats plus reproductibles. Les résultats du CHUM montrent une différence significative entre SHAM-VEH et BDL-VEH et entre SHAM-VEH et BDL-RIF. Aucune différence significative n'a été observée entre SHAM-VEH et BDL-LAC ou BDL-LAC+RIF. Le résultat d'un échantillon n'a pas pu être rendu par le laboratoire de biologie médicale du CHUM dans le groupe BDL-RIF. Pris ensemble ces résultats nous laissent à penser que les animaux BDL ont un taux plus élevé d'ammoniac que leurs congénères SHAM et qu'il existe un effet cumulatif de la combinaison de traitements LAC+RIF (notamment avec les résultats du laboratoire de biologie du CHUM).







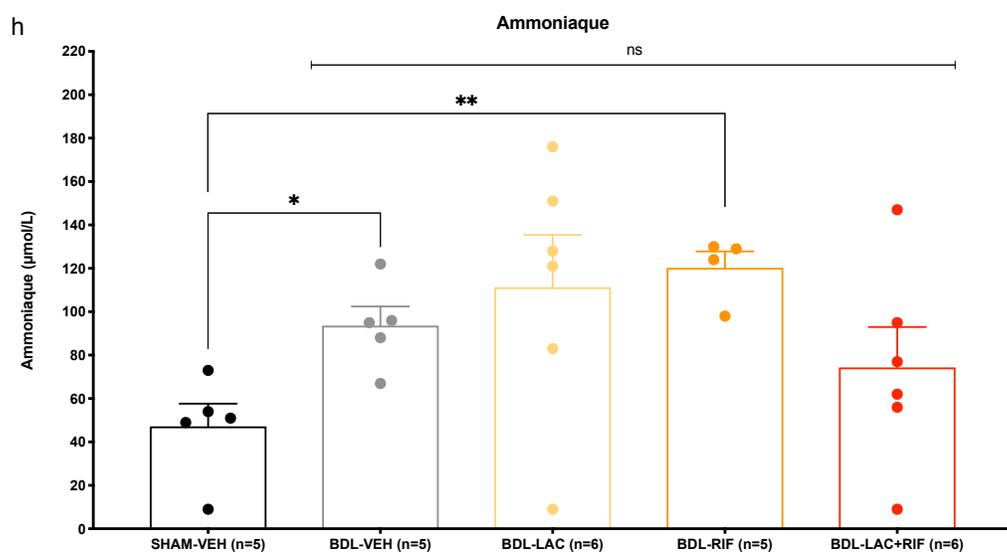
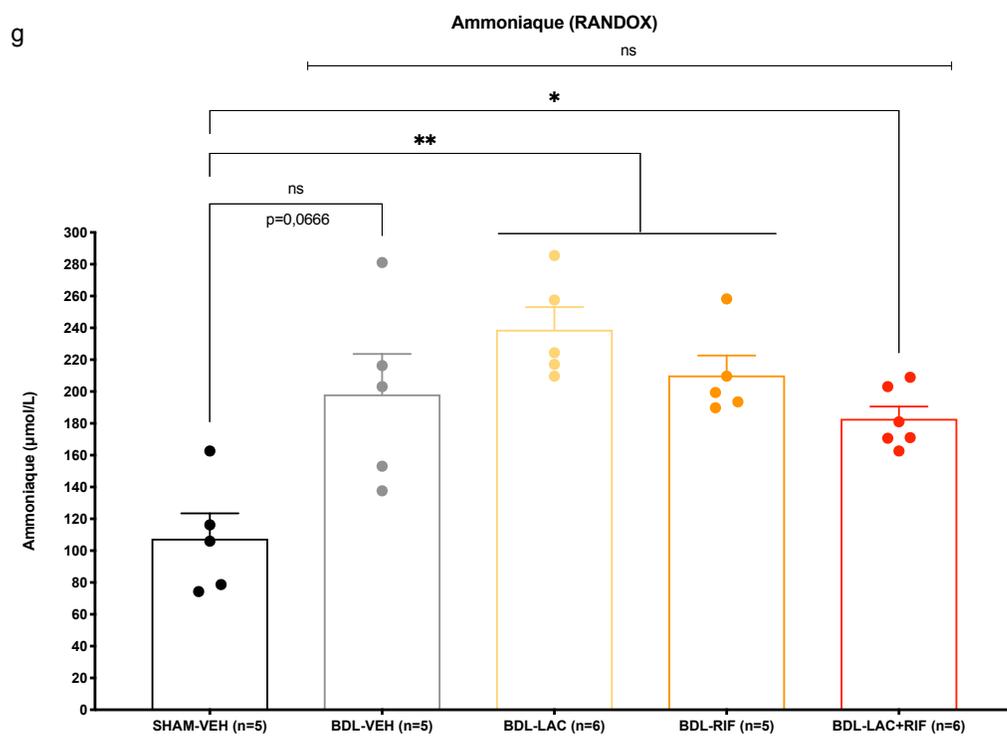


Figure 6. Paramètres biochimiques dont l'ammoniac dans l'ensemble de la cohorte.

a. Mesure de l'albumine b. Mesure de la bilirubine totale. c. Mesure des phosphatases alcalines. d. Mesure de la GGT, un point aberrant dans le groupe BDL-LAC a été exclu. e. Mesure de l'ALT. f. Mesure de l'AST, un point aberrant dans le groupe BDL-VEH a été exclu. g. Mesure de l'ammoniac par le kit Randox. h. Mesure de l'ammoniac par le laboratoire de biologie médicale du CHUM. Tous les paramètres ont été analysés par une analyse One-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (*) comme groupe contrôle pour tous les groupes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les animaux BDL ne présentent pas d'œdème cérébral

La mesure du pourcentage de gramme d'eau dans le tissu cérébral du cortex frontal droit a été réalisée par la méthode décrite par Marmarou et *al.* (Figure 7).

La présence d'œdème cérébral est une caractéristique fréquente mais inconsistante dans notre modèle de BDL, les résultats ne permettent pas de mettre en évidence la présence d'un œdème cérébral entre les différents groupes d'animaux BDL et SHAM ou entre les différents traitements. Il nous sera donc impossible d'évaluer un potentiel bénéfique des traitements via ce paramètre. Cependant, il est pertinent de montrer que ces traitements n'induisent pas d'élévation de la quantité d'eau dans le tissu cérébral. Il est possible qu'une autre méthode de mesure de l'œdème (mesure par la méthode dry/wet qui mesure la différence de poids entre une pièce de cortex fraîchement disséqué et la même pièce après 24h de déshydratation à 60 °C) puisse donner des résultats différents. Il est également possible que l'œdème soit une caractéristique transitoire dans le modèle apparaissant à un temps plus précoce ou plus tardif. De ce fait, même si aucun œdème n'est détectable au moment du sacrifice des animaux, il est possible qu'un œdème soit présent durant les périodes d'études comportementales ou que les conséquences d'un œdème plus précoce et résorbé soient toujours présentes au moment des tests comportementaux.

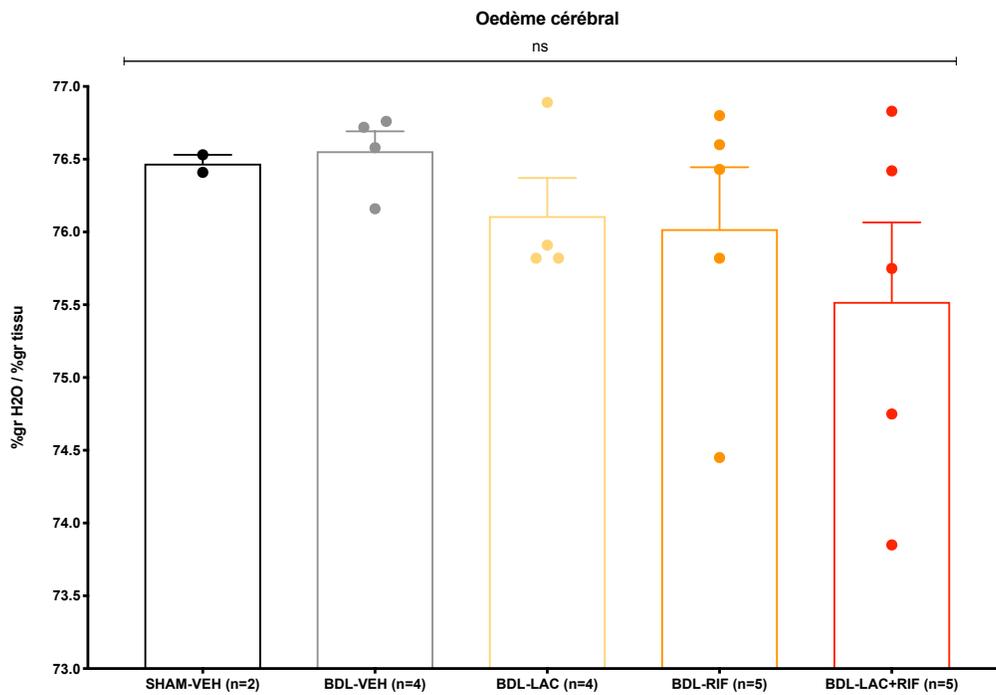


Figure 7. Mesure de l'œdème cérébral dans les différents groupes.

L'œdème cérébral a été mesuré dans le cortex frontal droit des animaux par la méthode de Marmarou *et al.* (1978). Tous les paramètres ont été analysés par une analyse One-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett

T3.

La mesure de la coordination motrice et de l'apprentissage par Rotarod n'a pas mis en évidence de différence par les traitements

La coordination motrice ainsi que la capacité d'apprentissage ont été mesurées par Rotarod (Figure 8).

La mesure de la coordination motrice (Figure 8a) s'effectue en comparant les différents groupes expérimentaux à un jour donné. A aucun jour, les résultats ne montrent de différence significative entre les groupes expérimentaux. La capacité d'apprentissage se traduit par une augmentation de la latence avant la chute au cours du temps. Seul le groupe BDL-LAC montre une augmentation de capacité d'apprentissage au cours du temps.

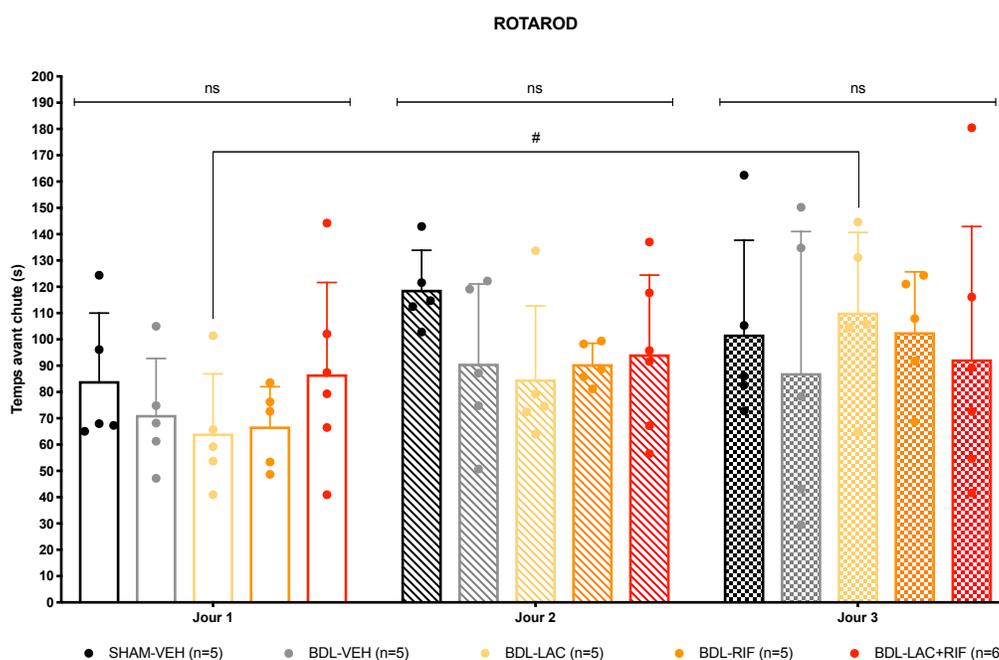


Figure 8. Analyse de la coordination motrice, de la mémoire et des capacités d'apprentissage par Rotarod (J+35, J+36, J+37 après chirurgie).

L'analyse de la coordination motrice a été réalisée par One-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3. L'analyse de la capacité d'apprentissage a été réalisée par Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Tukey. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec # pour $p < 0,05$.

La mesure de l'exploration, de la locomotion et de la sensation de peur par Open-Field test et l'anxiété ainsi que la dépression par Elevated Plus Maze test ne montre aucune différence par les traitements

L'exploration, la locomotion et la sensation de peur ont été mesurées par Open-Field test (Figure 9). L'anxiété ainsi que la dépression ont été mesurées par Elevated Plus Maze test (Figure 10).

L'Open-Field test permet de mesurer la sensation de peur et la locomotion (Figure 9a). En termes de locomotion et d'exploration, il n'y a aucune différence entre les groupes. Ceci nous permet de comparer le temps passé par chaque groupe dans les différentes zones sans biais. Les rats étant des animaux de proies, un comportement normal pour ces derniers serait de passer plus de temps dans la partie externe de la zone de test, à proximité d'un mur, ce qui est ressenti comme sécurisant pour l'animal. Un animal au comportement anormal passerait plus de temps dans la zone centrale, ce qui traduirait une perte de sensation d'instinct de conservation. Malgré certaines différences significatives dans le temps passé dans les zones externes et périphériques, aucune différence n'a pu être établie dans le temps passé dans la zone centrale. De ce fait, les traitements n'influencent pas l'instinct de préservation des animaux dans les différents groupes.

Dans l'Elevated Plus maze test, l'anxiété et la dépression sont mesurées par le temps passé dans les bras ouverts de la plateforme (Figure 10a). En termes de locomotion, il n'y a aucune différence entre les groupes. Ceci nous permet de comparer le temps passé par chaque groupe dans les différentes zones sans biais. De la même façon que pour l'Open-Field test, les animaux vont préférentiellement rester dans les zones à bras fermés, protégés autour de trois murs. Un comportement anormal sera pour l'animal de rester dans les zones à bras ouverts, sur une plateforme suspendue en l'air, qui est censée provoquer de l'anxiété chez l'animal. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents traitements.

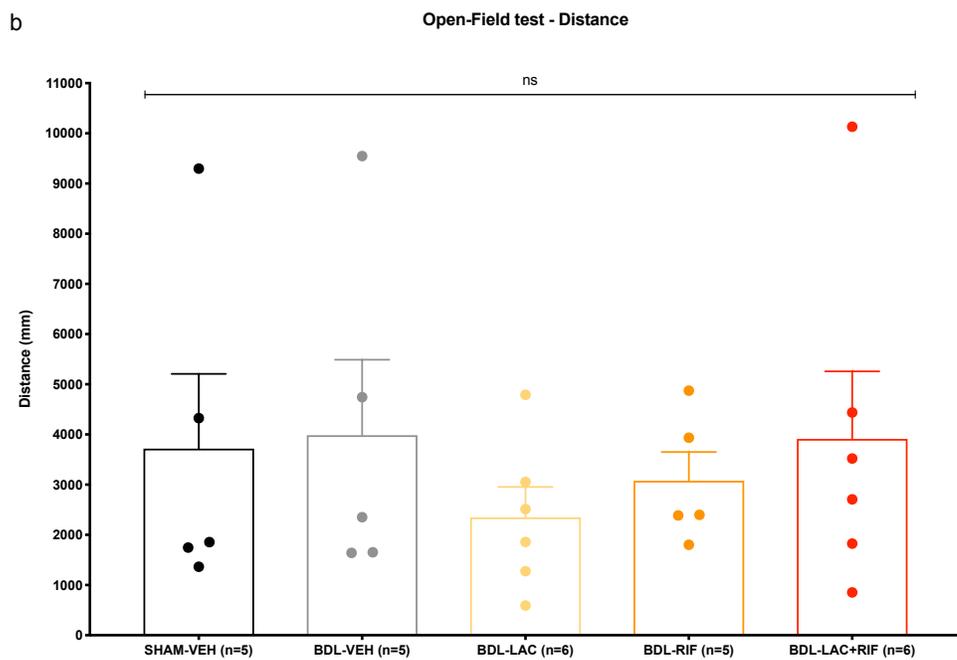
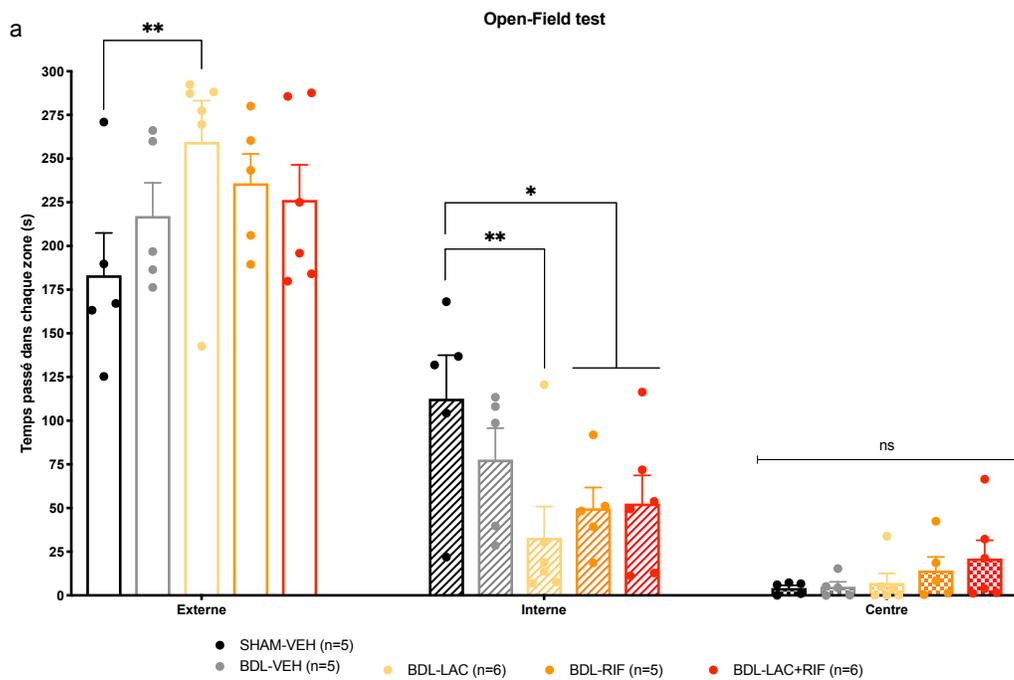


Figure 9. Mesure de la locomotion, de l'exploration et de la peur par Open-Field test (J+33 après chirurgie).

a. Quantification du temps passé dans chaque zone au cours de l'Open-Field test. b. Mesure de la distance parcourue au cours de l'Open-Field test. Les groupes ont été comparés entre chaque condition par une analyse Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH (*) comme groupe contrôle pour tous les groupes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * pour $p < 0,05$ et ** pour $p < 0,01$.

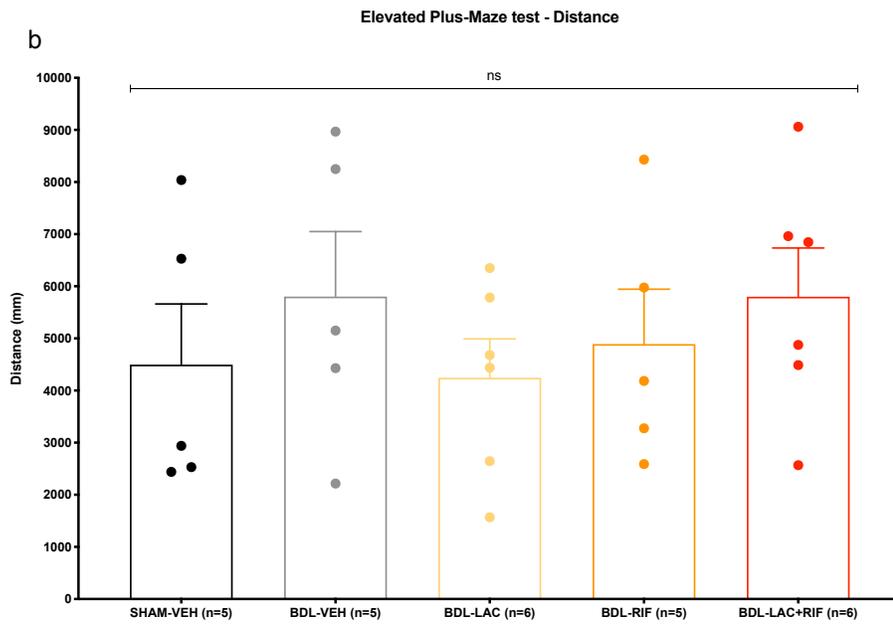
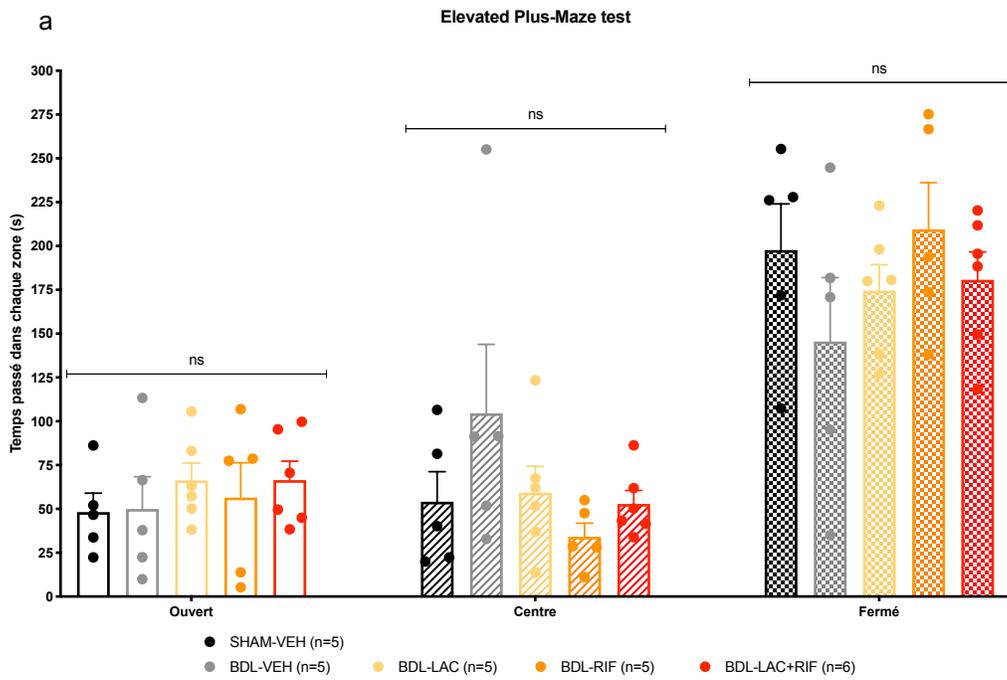


Figure 10. Mesure de l'anxiété et de la dépression par Elevated Plus Maze test (J+34 après chirurgie).

a. Quantification du temps passé dans chaque zone au cours de l'Elevated Plus Maze test. b. Mesure de la distance parcourue au cours de l'Elevated Plus Maze test. Les groupes ont été comparés entre chaque condition par une analyse Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

Les différents traitements montrent une amélioration de la mémoire à long terme

L'analyse de la mémoire et de la capacité d'apprentissage a été effectuée par Novel Object Recognition test (Figure 11).

L'index de discrimination (Figure 11) permet de définir l'intérêt que porte un animal vers l'objet familier ou le nouvel objet. Un index positif correspond à un intérêt pour le nouvel objet alors qu'un index négatif correspond à un intérêt pour l'objet familier. Les rats sont des animaux curieux, en présence d'un objet inconnu, ils vont avoir tendance à l'examiner. Cela se traduira par un index positif dans le Novel Object Recognition. Bien qu'aucune différence significative ne soit observée dans l'étude de la mémoire à court ou long terme, on peut observer une diminution d'intérêt pour le nouvel objet chez les animaux BDL-VEH alors que tous les animaux BDL traités conservent un intérêt pour le nouvel objet.

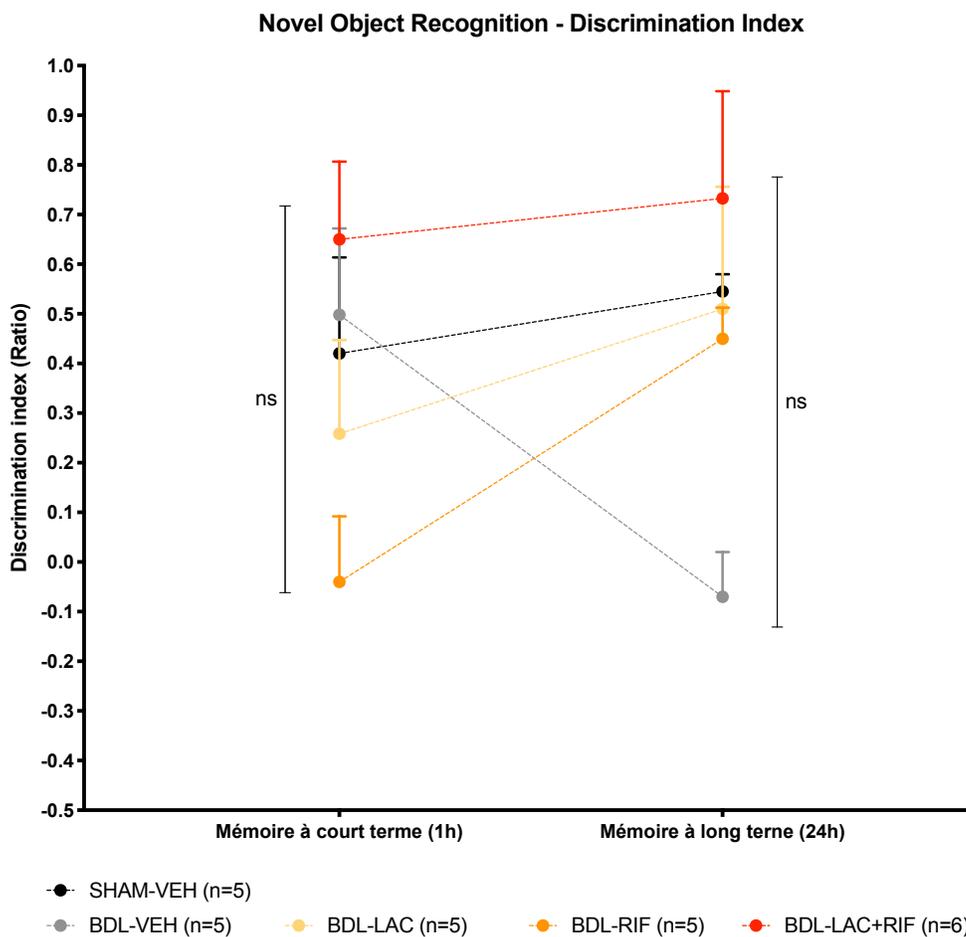


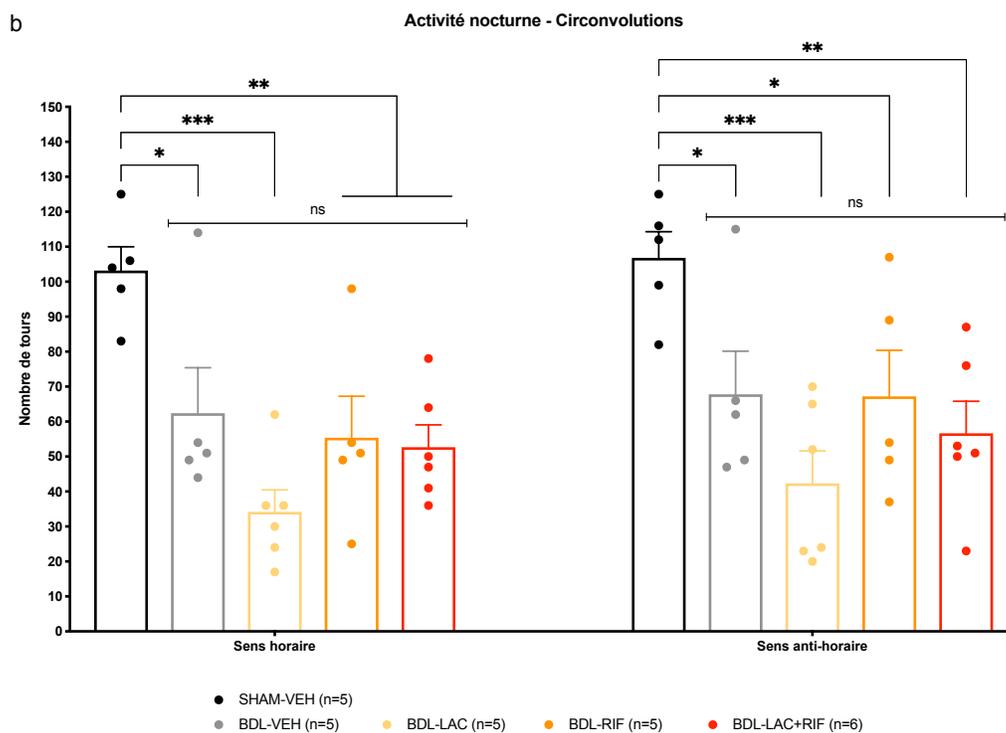
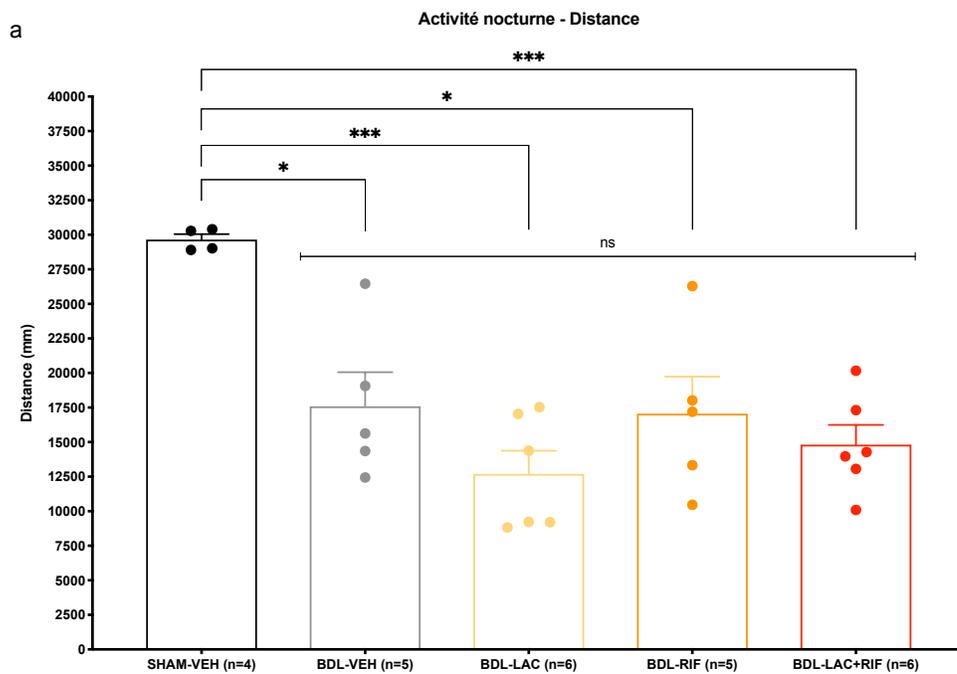
Figure 11. Mesure de la rétention mémorielle à court et long terme par Novel Object Recognition (J+31 et J+32 après chirurgie).

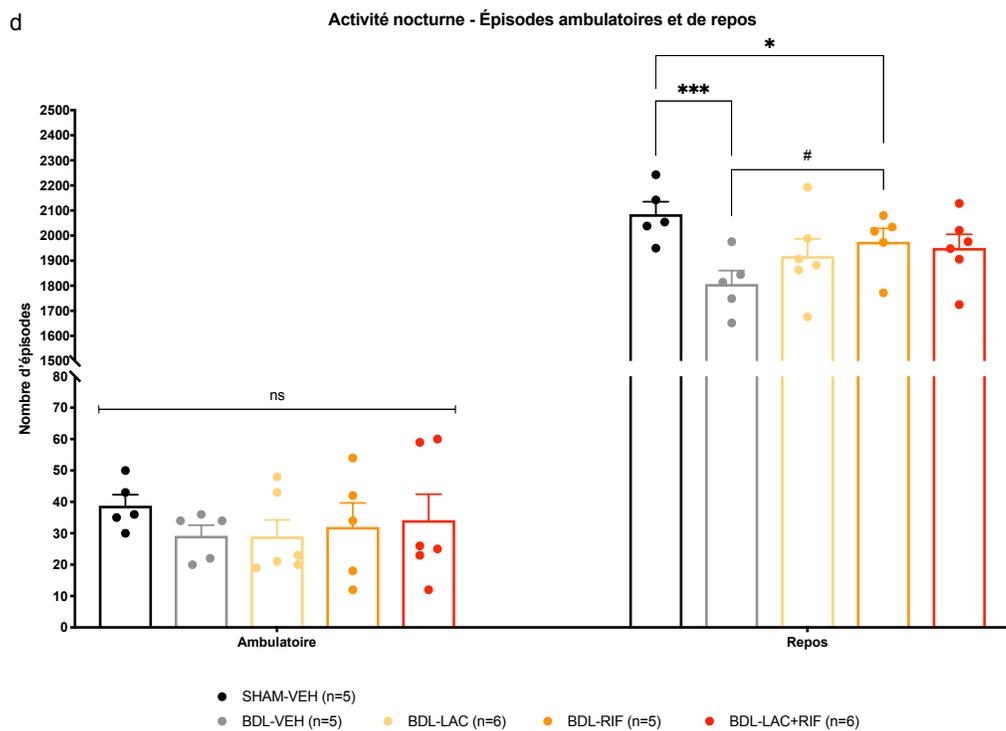
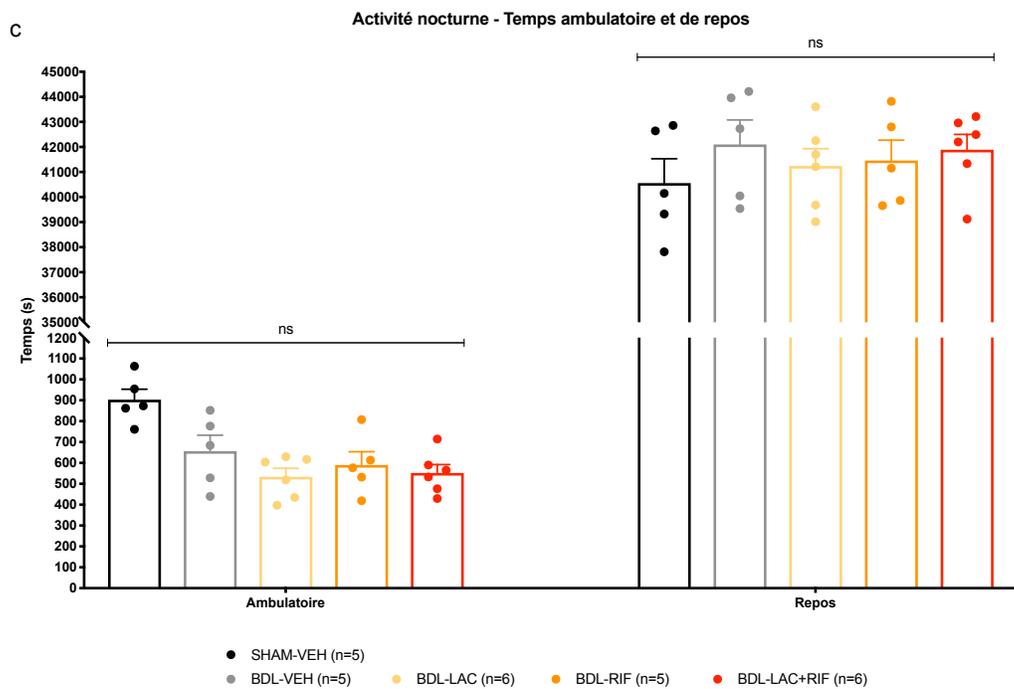
Mesure de l'index de discrimination pour la mémoire à court et à long terme. Les groupes ont été comparés entre chaque condition par une analyse Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM.

Aucune différence n'est observée dans l'exploration et la locomotion des animaux dans leur phase nocturne

L'exploration, la locomotion et la coordination motrice sont mesurées par l'activité nocturne (Figure 12).

De façon attendue, l'exploration et la locomotion sont diminuées dans les animaux BDL comparativement au SHAM-VEH sans différence par les traitements comme montrés par la distance parcourue et les différents autres paramètres mesurés durant l'activité nocturne. Tous les animaux BDL ont parcouru une moins grande distance durant la période nocturne (Figure 12a). Les animaux BDL montrent également moins de circonvolutions, sans préférence de sens (Figure 12b). Aucune différence n'a été observée dans le temps ambulatoire entre les différents animaux (Figure 12c). Aucune différence n'a été observée dans le nombre d'épisodes ambulatoires entre les différents animaux (Figure 12d). Les animaux BDL-VEH et BDL-RIF montrent moins d'épisodes de repos comparativement aux SHAM, en nombre absolu, ce nombre d'épisodes reste comparable. Le nombre de cambres que les animaux réalisent pour explorer leur environnement ne change pas dans les différents groupes (Figure 12e). Cependant, les animaux BDL-VEH, BDL-RIF et BDL-LAC ont un temps de cambre diminué comparativement aux animaux SHAM. Ceci peut suggérer que les animaux BDL-LAC+RIF qui ne montrent pas de différence significative avec les animaux SHAM sont moins incommodés.





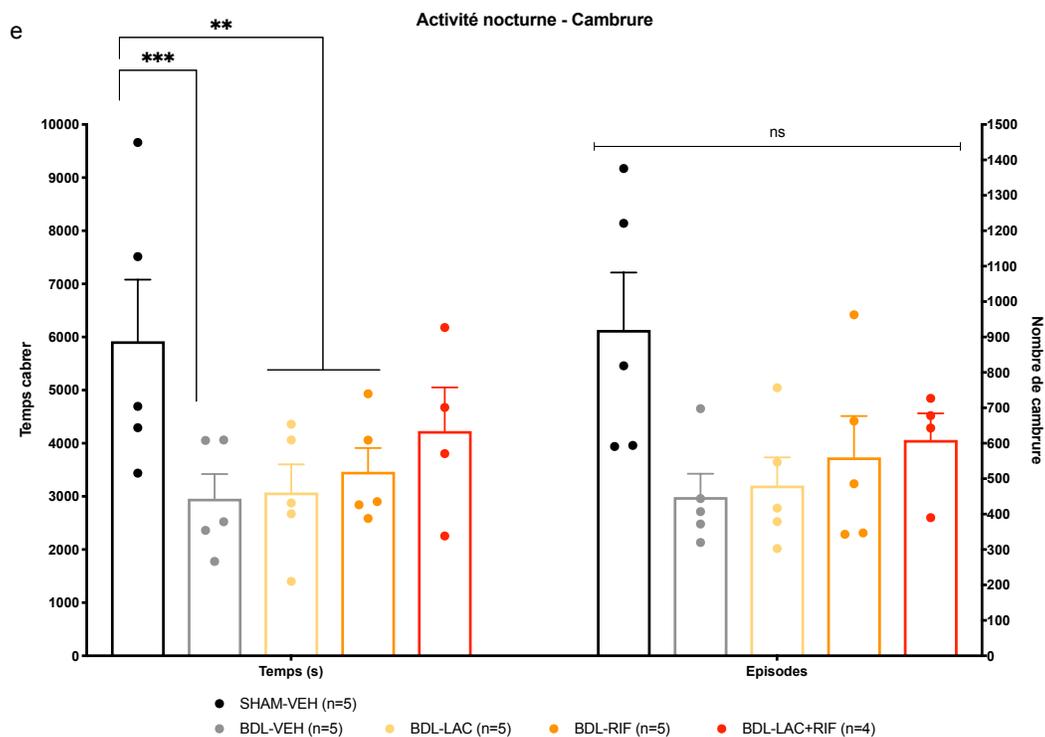


Figure 12. Mesure de l'activité nocturne (nuit entre J+34 et J+35 après chirurgie).

a. Mesure de la distance parcourue durant l'activité nocturne. b. Comparaison du nombre de circonvolutions dans le sens horaire ou antihoraire durant l'activité nocturne. c. Comparaison du temps de repos et du temps ambulateur durant l'activité nocturne. d. Comparaison du nombre d'épisodes de repos et du nombre d'épisodes ambulatoires durant l'activité nocturne. e. Nombre et durée des cambrures. Tous les paramètres ont été analysés par One-Way ANOVA est réalisée avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * pour $p < 0,05$; ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

Discussion et perspectives

La mortalité anormalement élevée des animaux (Figure 2) observée durant la période post-chirurgie est due au fait qu'un certain nombre d'animaux ont rouvert leurs sutures (SHAM n = 4, BDL n = 6) jusqu'à sortir leur propre intestin de la cavité abdominal. Ces animaux ont été immédiatement euthanasiés pour des raisons éthiques évidentes. Il est probable que la chirurgie ou les sutures soient en causes, mais il est également possible que la dose d'anesthésique et d'anti-inflammatoire ait insensibilisé les animaux à la douleur, de nouvelles recommandations sont en cours d'établissement par le CIPA pour donner suite à ces événements. Globalement, nous n'avons pas observé d'effets secondaires indésirables ou délétères des traitements durant cette étude dans notre modèle. Aucun des traitements n'améliore la survie des animaux et les pertes sont relativement équivalentes entre les groupes.

De façon attendue, les animaux SHAM croissent plus que leurs congénères BDL le long du modèle dans les différents groupes expérimentaux (Figure 3). L'appétit des animaux SHAM est équivalent à celui des animaux BDL à l'exception de la première semaine (Figure 4) car les animaux BDL récupèrent moins bien et moins vite. Il est probable que la différence de poids qui ne semble pas être en lien avec une diminution de l'appétit soit la résultante d'une malabsorption des nutriments, notamment des lipides qui seraient mal émulsionnés par l'absence de bile.

Tous les animaux BDL ont des valeurs de composition corporelle perturbées face aux animaux SHAM sans différence significative dans les traitements. La valeur de la masse maigre (Figure 5b) ne reflète pas réellement la masse musculaire pour laquelle nous nous attendrions à voir une valeur diminuée dans les animaux BDL. Par ailleurs, notre laboratoire a précédemment mis en évidence une perte de masse musculaire et diminution de la synthèse protéique musculaire (Bosoi C.R. et *al.*, 2017). Les valeurs de masse grasse (Figure 5a) et de masse sèche ne peuvent pas être mises en relation directe avec la consommation de nourriture, notamment dans les animaux BDL pour lesquels nous suspectons un défaut d'absorption de certains nutriments. Le taux de masse hydrique totale (Figure 5c) plus faible dans les animaux BDL ne traduit pas macroscopiquement une déshydratation visible chez ces derniers. Le taux de masse hydrique libre (Figure 5d) augmenté en fin de modèle dans les animaux BDL peut corrélérer avec

le volume d'ascite qui se forme normalement chez ces animaux. Il a été noté également qu'une valeur élevée de masse hydrique libre se retrouve chez les animaux les plus faibles dont le phénotype de l'avancement de la cholestase hépatique est plus fort.

Les paramètres biochimiques de la fonction hépatique et l'ammoniac (Figure 6) montrent que les animaux BDL ont un avancement attendu du phénotype de la cholestase hépatique sans qu'aucun effet des traitements n'ait pu être mis en évidence. L'ALT (Figure 6f) étant un marqueur plus précoce et plus spécifique de l'injure hépatique, nous n'observons pas de différence significative entre les animaux SHAM et BDL, il est possible qu'avec un nombre d'animaux plus élevé une différence significative serait observée. L'ammoniac étant un paramètre sensible et difficile à analyser, le taux d'ammoniac peut varier au cours du temps (même une fois l'échantillon congelé) ou en fonction des cycles de congélation/décongélation des échantillons ou encore du temps avant mesure sur un échantillon frais/décongelé. C'est pourquoi la mesure a été réalisée par deux méthodes, le kit Randox (Figure 6g) sur des échantillons fraîchement prélevé et conservé dans la glace et par le laboratoire de biologie médicale du CHUM (Figure 6h) sur des échantillons décongelés précédemment conservés à -80°C en même temps que les autres paramètres biologiques. Pris ensemble ces résultats semblent nous confirmer une augmentation du taux d'ammoniac dans les animaux BDL avec une tendance à la normalisation dans le groupe BDL-LAC+RIF. Ainsi l'effet cumulatif des deux traitements serait nécessaire pour faire diminuer le taux d'ammoniac dans notre modèle. Sans avoir d'effets directs significatifs sur les paramètres de la fonction hépatique, il est tout de même possible que les traitements utilisés dans cette étude aient une action directe sur d'autres fonctions et d'autres organes.

L'œdème cérébral est un paramètre normalement présent dans notre modèle (Bosoi C.R. et al., 2013) qui peut être également présent chez les patients atteints de maladie hépatique chronique et d'HE. Cependant d'autres groupes ont mis en évidence de l'œdème que si les animaux ont une diète contenant de l'ammoniac (Jover R. et al., 2006). L'absence de différence observée au cours de ce projet peut être expliquée par le faible nombre d'animaux disponibles pour la mesure. L'œdème étant un autre paramètre sensible et difficile à mesurer, il serait intéressant de mesurer ce paramètre par une deuxième technique (*weight/dry ratio*). L'œdème est un paramètre qui peut être transitoire et inconsistant, c'est pourquoi nous nous attendions à

pouvoir voir les conséquences d'un œdème précédemment résorbé ou d'un œdème de bas grade pour lequel notre technique pourrait manquer de sensibilité. Bosoï et *al.* (Bosoï et *al.*, 2012) ainsi que Xialing Yang (Yang, 2009) ont montré la présence d'œdème dans des rats BDL non traités 6 semaines après l'intervention chirurgicale comparativement aux animaux SHAM. Les valeurs obtenues dans cette étude pour les animaux SHAM est comparable à l'étude de Bosoï et *al.*, ce qui nous conforte dans les résultats obtenus ici. Jover et *al.* (Jover et *al.*, 2006) utilisent la même technique pour mesurer l'œdème cérébral et ne trouve aucune différence entre SHAM et BDL chez des rats Wistar deux semaines après chirurgie de ligation des voies biliaires. Cudalbu et *al.* (Cudalbu, 2019) ont récemment publié une revue de littérature des différentes études analysant l'œdème cérébral dans des animaux SHAM vs BDL qui montre une différence dans le contenu en eau dans le cerveau uniquement à partir de 6 semaines post-chirurgie par méthode gravimétrique. Ces données semblent corroborer une présence dynamique de l'œdème dans le modèle BDL et expliquerait le fait que nous n'en voyons pas dans cette étude où les animaux sont étudiés sur une période de moins de 6 semaines.

Les animaux ne montrent aucune déficience dans leur locomotion (Figure 8 et 12), bien que le modèle de ligature de la voie biliaire montre régulièrement une diminution de l'apprentissage et un déficit de la coordination motrice, ces résultats assurent la validité des résultats pour les autres tests comportementaux qui sont basés sur le mouvement des animaux. Une autre étude (Heidari et *al.*, 2018) a montré une différence dans le temps avant latence entre SHAM et BDL contrairement à notre étude. Dans notre étude la vitesse de révolution du cylindre sur lequel est placé le rat augmente progressivement alors que dans l'étude d'Heidari et *al.* la vitesse est maintenue constante.

La peur est un sentiment normal pour le rat qui en tant que rongeur est un animal de proie et ira naturellement éviter de se déplacer dans la zone centrale dans l'Open-Field test (Figure 9). De la même façon, les animaux devraient passer plus de temps dans les bras fermés de l'Elevated Plus maze test (Figure 10) car la sensation de hauteur est un élément stressant. Concrètement, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les animaux SHAM et BDL ou entre les différents traitements. Certaines études vont dans le sens d'une partie résultats observés (Leke R., 2012), notamment que les animaux BDL passent plus de temps dans la zone externe et qu'il n'y a pas de différence dans leur temps passé dans les bras fermés. L'anxiété est

un paramètre relativement inconsistant dans les précédentes études que nous avons menées (données non publiées) et les animaux BDL ne montrent pas toujours le phénotype que l'on pourrait attendre.

Il est intéressant de voir que les traitements semblent avoir un effet sur la mémoire à long terme (Figure 11). Néanmoins, il faut noter qu'aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents traitements. Le lactulose a été démontré comme ayant une activité bénéfique sur la cognition (Prasad S. et *al.*, 2007) mais ceci n'a pas été démontré pour la rifaximine.

Cette étude présente de nombreuses limitations, principalement le manque de significativité dans les tests statistiques entre les groupes SHAM-VEH et BDL-VEH notamment dans les tests comportementaux. Un élément qui pourrait expliquer ce manque de significativité pourrait être le nombre inégal et parfois faible d'animaux, secondaire aux décès post-chirurgicaux, entre les groupes qui diminue la puissance des tests. Notre protocole pour les tests comportementaux prévoit une période d'habituation des animaux de 45 minutes dans la salle d'expérience or la plupart des études comportementales prévoient une période d'une semaine d'habituation afin de diminuer le stress des animaux avec le test (Walf et *al.*, 2013). Dans le cas de l'œdème cérébral, l'absence de différence comme justifié ci-avant pourrait s'expliquer par la temporalité de ce paramètre dans le modèle, présent uniquement à partir d'un plus grand nombre de semaines post-chirurgie. Ceci peut être une piste pour expliquer l'absence de différence statistique dans les tests comportementaux (en rapport avec la coordination, l'anxiété et la mémoire). Il est possible que des différences entre SHAM et BDL apparaissent au moment ou consécutivement à l'apparition de l'œdème cérébral. D'autres études conduites par notre laboratoire (données non publiées) ont montré des effets sur la locomotion, la mémoire ou l'anxiété sur des animaux suivant le modèle jusqu'à 6 semaines. L'absence de différence observée ici peut être également due à la dose de traitement utilisé ou à la durée du traitement. Nous avons utilisé une dose similaire aux études de Odena et *al.* et Kumar et *al.* (Odena et *al.*, 2012; Kumar et *al.*, 2017) pour modéliser notre étude de façon à traduire chez le rat les doses utilisées en clinique chez un patient. Cependant, il est possible que les doses et la durée du traitement soit infraclinique chez l'animal et que des doses plus élevées, sur une plus longue période, soient requises pour voir un effet significatif des traitements.

Il serait intéressant de refaire cette étude en augmentant le nombre d'animaux par groupe. Il serait également possible de porter le modèle à cinq semaines comme le phénotype des animaux ne semble pas tant différent entre la quatrième et la cinquième semaine mais la survie est bien meilleure à cinq semaines car moins d'animaux décompensent leur cirrhose. Après quatre semaines, la cirrhose des animaux BDL continue de progresser, ceux-ci ont un ictère et une jaunice plus prononcée, continuent à maigrir et s'affaiblissent jusqu'à développer des troubles respiratoires qui nous obligent à les euthanasier. Par ailleurs, il serait possible d'augmenter la dose de rifaximine car les animaux ne sont sans doute pas aussi sensibles à la médication que les humains. Il n'est pas possible d'augmenter la dose de lactulose car celle-ci est manufacturée telle quelle et nous donnons déjà la dose maximum pour le gavage. Les résultats avec le lactulose corroborent nos précédents résultats, à savoir que ce dernier n'a pas d'effet sur l'ammoniac dans notre modèle. Finalement, l'HE est une condition qui apparaît en épisodes, nous avons développé un nouveau modèle pour reproduire l'apparition d'un épisode en injectant une dose d'ammoniac i.p. chez les animaux BDL, les animaux perdent alors leur réflexe de posture et l'épisode peut même induire un état comateux. Une nouvelle modélisation de l'étude consisterait à induire un ou plusieurs épisodes après que les animaux aient récupéré de leur chirurgie. Ceci accentuerait le phénotype de l'HE entre BDL et SHAM. Puis les animaux recevraient les différents traitements et nous pourrions mesurer à nouveau les différents paramètres biologiques et comportementaux. Il pourrait être également intéressant d'essayer d'induire un épisode avec la même dose d'ammoniac que pour les premiers épisodes et voir si cela est suffisant pour induire un épisode avec la même gravité ou si les traitements arrivent à prévenir la survenue de l'épisode.

Globalement, cette étude n'a pas permis d'une part de mettre en évidence la supériorité de la rifaximine sur le lactulose et d'autre part de mettre en évidence l'efficacité des traitements sur plusieurs paramètres attendus dans notre modèle murin de cholestase hépatique.

Évaluation de composés anti-fibrotiques comme traitements prophylactiques de la cirrhose dans un modèle murin de cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire

Introduction

Contexte de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un contrat MITACS Accélération avec la compagnie Montréalaise Clementia Pharmaceuticals Inc. Le directeur de cette étude est le docteur Christopher Rose, Ph.D. et directeur du laboratoire d'hépto-neuro du CRCHUM, le projet est réalisé par Grégory Petrazzo, M.Sc., sous la supervision du docteur Rafael Ochoa-Sanchez, Ph.D. Le parrainage par l'entreprise Clementia est supervisé par le docteur Michel Paré, Ph.D., qui acte comme commanditaire en liaison avec le laboratoire sur le projet.

Cette étude est réalisée en partenariat avec le laboratoire de biologie médicale du CHUM pour la mesure des marqueurs de la fonction hépatique, la plateforme d'histologie de l'IRIC de Montréal pour réaliser des lames et des colorations des tissus hépatiques et avec le Docteur Bich Hong Nguyen chef du service de pathologie chez Grappe Optilab au CHUM pour déterminer le score MÉTAVIR et son interprétation.

Rationalisation de l'étude

La fibrose est un mécanisme de réparation tissulaire en réponse à une injure cellulaire. La fibrose hépatique correspond à un remodelage de la matrice extracellulaire qui est alors remplacée par des fibres de collagène de type I et de la fibronectine. Quelles que soient les étiologies, les fonctions hépatiques vont diminuer à mesure que la fibrose progresse, ceci a de nombreuses conséquences sur la digestion des lipides, le métabolisme et la détoxification. Plus la fibrose hépatique progresse, moins elle est réversible. Il est généralement admis que quand la fibrose a progressé jusqu'au stade de cirrhose, celle-ci devient irréversible et conduit

fréquemment à une insuffisance hépatique terminale mais peut également évoluer en carcinome hépatocellulaire.

Dans ce contexte, il est tout à fait pertinent d'évaluer l'efficacité de composés anti-fibrotiques qui auraient un intérêt particulier dans les stades précoces d'injure hépatique et de fibrose. Pour notre laboratoire qui focalise son attention sur l'HE, une condition secondaire aux maladies hépatiques dont l'apparition des symptômes et des épisodes peut corrélérer avec l'aggravation de la fibrose, la possibilité de freiner voire d'atténuer la fibrose est une stratégie thérapeutique intéressante. Cependant, cette étude se focalise essentiellement sur la fibrose.

Plusieurs composés ayant une action anti-fibrotique directe ou indirecte en réduisant l'atteinte hépatique (UDCA, OCA) seront testés dans cette étude. L'acide ursodésoxycholique (HE H. et *al.*, 2011) est un acide biliaire secondaire sous-produit du métabolisme des bactéries intestinales. En clinique, l'utilisation de l'acide ursodésoxycholique est strictement limitée à la cholangite biliaire primitive depuis 1996 et à la dissolution des lithiases biliaires depuis 1987 (Ullrich D. et *al.* 1987). La rapamycine (Patsenker E. et *al.*, 2011) aussi appelée sirolimus est un médicament immunosuppresseur de la famille des ciclosporines dont le mécanisme d'action passe par l'inhibition de la protéine mTOR. La rapamycine est approuvée aux États-Unis depuis 1999 pour la prévention du rejet des greffes. L'acide obéticholique (Verbeke L. et *al.*, 2011) est un acide biliaire semi-synthétique. L'acide obéticholique est approuvé aux États-Unis depuis 2016 pour le traitement des cholangites biliaires primitives. La pirfénidone (Peng Y. et *al.*, 2014) un composé immunosuppresseur avec des propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. La pirfenidone est approuvée depuis 2014 aux États-Unis pour traiter la fibrose pulmonaire. Ces composés sont à l'étude depuis le début des années 2000 et sont utilisés dans de nombreuses études cliniques (Yoon et *al.*, 2016). Ces études se concentrent essentiellement sur les NALFD, il serait intéressant de voir l'effet de ces traitements dans d'autres étiologies, ainsi que d'évaluer plus en profondeur les mécanismes inflammatoires et fibrogéniques.

Nous émettons l'hypothèse que ces composés auront un effet favorable pour prévenir l'avancement de la fibrose et de la cirrhose dans notre modèle de cholestase hépatique.

Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de composés anti-fibrotiques dans un modèle murin de ligature de la voie biliaire. Plus précisément, tous les traitements seront administrés quotidiennement pendant deux à quatre semaines à partir de l'établissement d'une injure hépatique et plusieurs paramètres seront évalués pour confirmer l'efficacité des traitements.

Modélisation de l'étude

Pour cette étude, trois groupes ont été établis en fonction de la temporalité du modèle (Figure 13). Les trois groupes définis sont respectivement : une, trois et cinq semaines de durée du modèle après la chirurgie et avant le sacrifice. Brièvement, tous les animaux sont hébergés à l'animalerie du CRCHUM et associés à une chirurgie de ligature de la voie biliaire (BDL) ou à un simulacre de la chirurgie (SHAM). Notre modèle BDL d'étude de l'HE étant un modèle de cholestase hépatique est donc également pertinent pour l'étude de la cirrhose. Pour cette étude, nous ne nous intéresserons pas aux caractéristiques neurologiques du modèle mais plutôt sur les caractéristiques hépatiques. En effet, notre modèle récapitule une injure chronique par cholestase induisant une destruction progressive du foie. Les animaux sont suivis pour toute la durée de leur modèle au niveau de leur poids pour la croissance et de leur consommation de nourriture. Une semaine après la chirurgie, les animaux qui poursuivent le modèle jusqu'à trois et cinq semaines sont associés au traitement par gavage d'un des composés tests (acide obéticholique 5 mg/kg, rapamycine 2 mg/kg, pifénédone 240 mg/kg ou acide ursodésoxycholique 30mg/kg) ou du véhicule utilisé pour dissoudre les composés. A la fin de chaque modèle, les animaux sont euthanasiés, un échantillon de sang est prélevé pour mesurer les biomarqueurs hépatiques (ALT, AST, GGT, PAL, bilirubine et albumine), un échantillon de foie est utilisé pour mesurer le contenu en hydroxyproline et un autre échantillon de foie est utilisé pour analyse histologique du tissu hépatique (collagène, nécrose, inflammation, etc.). Les résultats seront présentés d'une part de façon globale avec les données pour tous les animaux mis en commun à chaque temps (par semaine) et pour chaque groupe dans leur propre temporalité (groupe 1 semaine, groupe 3 semaines et groupe 5 semaines qui sera réduit à 4 semaines au cours de l'étude).

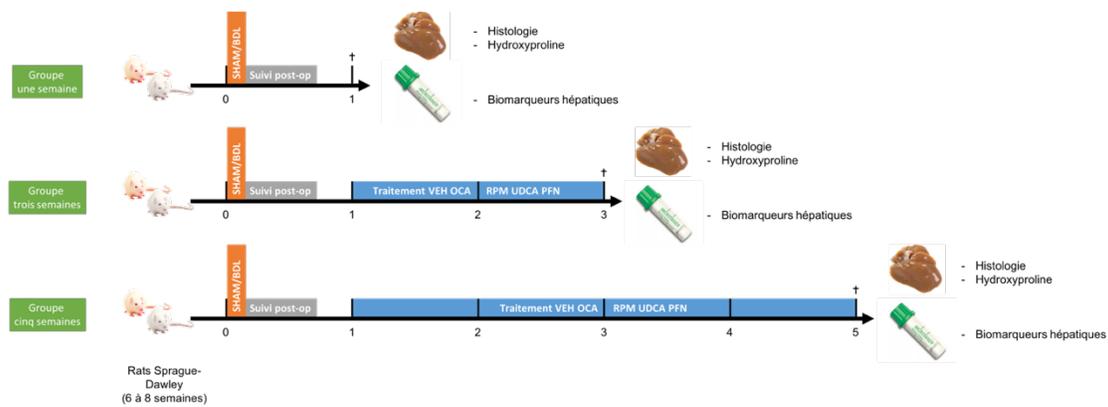


Figure 13. Graphique simplifié du plan de l'étude originellement établi.

Trois groupes expérimentaux ont été réalisés en parallèle en fonction de leur durée (une, trois ou cinq semaines après chirurgie et avant sacrifice). Tous les animaux subissent une chirurgie de ligature de la voie biliaire ou le simulacre de chirurgie. Une semaine après la chirurgie, les animaux reçoivent un des différents traitements (OCA pour acide obéticholique, RPM pour rapamycine, UDCA pour acide ursodéoxycholique, PFN pour pirfenidone) ou le véhicule (VEH) jusqu'à la fin du modèle. En fin de modèle, tous les animaux sont sacrifiés, leur foie est collecté pour réaliser l'histologie des tissus et mesurer le contenu en hydroxyproline d'une part et d'autre part un échantillon de sang est prélevé pour mesurer les biomarqueurs hépatiques.

Matériels et méthodes

Réactifs et traitements

Le DMSO et l'huile de maïs ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, CO, USA; 67-68-5 et C8267-2.5L respectivement). Tous les composés ont été stockés en accord avec les recommandations du fabricant. Tous les autres composés ont été obtenus auprès de Toronto Research Chemicals (North York, ON) et stockés à -20 °C ou $+4\text{ °C}$ en accord avec les recommandations du fabricant.

Tous les traitements ont été préparés hebdomadairement en dissolvant le composé dans un véhicule composé de 5% DMSO et de 95 % d'huile de maïs, tel que :

Composé	Préparation (mg/ml)	Posologie (mg/kg)
Acide obéticholique (OCA)	1	5
Rapamycine (RPM)	0,4	2
Acide ursodésoxycholique (UDCA)	6	30
Pirfénidone (PFN)	48	240

Les composés ont d'abord été dissous dans le DMSO, la solution a alors été chauffée sur une plaque à 65 °C jusqu'à dissolution complète avant l'ajout de l'huile. Toutes les préparations ont été aliquotées dans des flacons en verre pour une utilisation quotidienne. Dans le cas où des précipités cristallins se sont formés dans le fond des flacons, les solutions ont de nouveau été chauffées sur une plaque à 65 °C jusqu'à dissolution complète. Avant administration, les solutions sont refroidies à température ambiante. Tous les traitements ont été administrés aux mêmes heures avec une canule de gavage en plastique adaptée sur une seringue de 10 ml. Le volume de gavage administré à 5 ml/kg est ajusté quotidiennement au poids des animaux (voir table ci-avant, Posologie).

Modèle animal

Tous les animaux (n = 103) utilisés dans l'étude sont des rats mâles (*Rattus norvegicus*) de souche Sprague-Dawley obtenus auprès de Charles River (Saint-Constant, QC), âgés de six à huit semaines et pesant entre 179 g et 265 g. Tous les animaux ont été hébergés à l'animalerie du CRCHUM dans des cages conventionnelles solides non stériles avec filtre, deux animaux par cage, avec des conditions d'hébergements rigoureusement contrôlées (température : 20 – 22 °C, humidité : 45 – 60 %, cycle diurne et nocturne de 12 heures). Les animaux sont nourris *ad libitum* avec une nourriture calibrée et standard (Irradiated 2018 Teklad Global 18 % protein rodent diet) obtenue auprès d'Envigo Laboratories Inc. (Wyton, UK) et ont un accès *ad libitum* à une valve d'eau filtrée et distillée. Une période d'adaptation de deux jours est observée pour tous les animaux nouvellement arrivés à l'animalerie avant toute manipulation.

Par la suite, tous les animaux ont subi une chirurgie de ligature de la voie biliaire ou un simulacre de cette chirurgie et ont été assignés à un des trois modèles expérimentaux qui correspondent à la durée du modèle avant sacrifice des animaux. La durée des modèles est soit de : une semaine (n = 14, 4 SHAM et 10 BDL), trois semaines (n = 24, 4 SHAM-VEH et 4 BDL par traitement) ou cinq semaines (n = 65, 10 SHAM-VEH et 11 BDL par traitement). Après la première semaine de chirurgie, pour les groupes expérimentaux trois et cinq semaines, les animaux sont assignés à un des traitements à tester ou au véhicule qu'ils recevront pendant deux ou quatre semaines avant leur sacrifice. Au moment du sacrifice, un échantillon de plasma est prélevé pour mesurer les biomarqueurs hépatiques. Un échantillon de foie est prélevé pour mesurer le contenu en hydroxyproline et un autre échantillon pour analyse histologique du tissu.

Les deux rats d'une même cage recevant le même traitement, la consommation de nourriture de toutes les cages est relevée hebdomadairement et ramenée par animal. La croissance des animaux est évaluée en mesurant quotidiennement le poids de tous les animaux. De plus, les comportements et la condition générale de tous les animaux sont soigneusement surveillés pour tout signe de décompensation, cela inclut notamment la démarche, l'activité, l'hydratation, l'aspect du pelage et des yeux, tout signe de léthargie ou d'alopécie. Tout animal présentant une perte de poids de plus de 20 % au cours des trois derniers jours, qui présente un taux de déshydratation sévère ou qui ne réagit à aucun stimulus physique ou vocal a été euthanasié. Tous les protocoles expérimentaux ont été conduits en accord avec les directives du

conseil canadien de protection des animaux et approuvés par le comité institutionnel de protection animal du CRCHUM.

Procédures chirurgicales

Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées dans des conditions strictes de stérilité par le docteur Shijie Qi pour les chirurgies de ligature de la voie biliaire et par Rafael Ochoa-Sanchez pour les simulacres de chirurgies de ligature de la voie biliaire.

Le jour de la microchirurgie, les animaux sont amenés dans la salle de chirurgie et reçoivent une injection d'anti-inflammatoire non stéroïdien (carprofène 50 mg/ml, i.p., 5ml/kg) au minimum une heure avant l'intervention. Au moment de l'intervention, les animaux sont endormis et maintenus inconscients par un flux constant d'isoflurane, leur pelage est rasé au niveau abdominal et plusieurs injections d'un anesthésique local (bupivacaïne 2,5 mg/ml dilué au 1:10 en s.c.), jusqu'à un total de 1 ml, sont réalisées au niveau du site chirurgical. Durant toute la procédure, les animaux sont placés sur un coussin chauffant pour prévenir toute hypothermie, chaque intervention dure en moyenne 20 minutes. Une laparotomie médiane de 2 cm est réalisée le long de la ligne blanche, les tissus sous-cutanés, le péritoine et les muscles abdominaux sont écartés. Les intestins sont abaissés de façon à pouvoir parfaitement mobiliser le foie et exposer le canal biliaire commun. Une injection intracholédocienne de 0,5 ml formaline (10 % formaline), préparée extemporanément, est réalisée pour empêcher toute future dilation du canal biliaire résiduel. Le canal biliaire commun est ligaturé par un fil de soie 4-0 en amont et en aval avant d'être sectionné. Après avoir repositionné le foie, les intestins sont repositionnés, la muqueuse péritonéale ainsi que la peau sont suturées par un fil de soie 6-0. A la fin de la procédure, les animaux sont hébergés dans un incubateur à 37 °C pour le reste de la journée avant de retourner dans leur hébergement à l'animalerie.

Les animaux sont surveillés rigoureusement pendant les cinq jours postopératoires suivants pour tout signe de douleur, perte anormale de poids ou de déshydratation. Durant les trois premiers jours postopératoires les animaux ont reçu une dose quotidienne de carprofène i.p. pour contrôler la douleur. Les animaux reçoivent quotidiennement une supplémentation de nourriture humide et en Ensure® Plus (les trois premiers jours seulement) pour les aider à mieux récupérer.

Mesure des biomarqueurs hépatiques

En fin de modèle, les animaux sont systématiquement euthanasiés. Tous les animaux sont alors endormis et maintenus inconscients par un flux continu d'isoflurane. Une laparotomie est réalisée, les organes sont abaissés afin d'exposer le diaphragme qui est alors ouvert pour créer un pneumothorax. Le cœur alors exposé permet de réaliser une ponction cardiaque avec une seringue préhéparinée, 4 à 5 ml de sang total est collecté, aliquoté en tubes Eppendorf et centrifugé 15 minutes à 200 G à 4 °C. Après centrifugation, le plasma est collecté dans de nouveaux tubes Eppendorf et instantanément congelé avec de la glace sèche dans une solution d'isobutanol et conservé à – 80 °C avant analyse.

Tous les échantillons sont ultérieurement décongelés et envoyés au laboratoire de biologie médicale du CHUM pour mesurer les enzymes hépatiques ALT, AST, GGT, PAL mais également les produits du métabolisme hépatique bilirubine et albumine.

Histologie des tissus hépatiques

Le jour du sacrifice, après le prélèvement sanguin, le foie est mobilisé et soigneusement prélevé pour être disséqué. L'apex du lobe gauche est sectionné puis immédiatement placé dans une cassette d'histologie et immergé dans une solution formaline à 10 % fraîchement préparée. La solution de formaline est fraîchement remplacée tous les jours pendant deux jours et les cassettes sont conservées dans la formaline jusqu'à analyse. Les échantillons de foie en cassettes ont été transférés dans une solution de PBS et transmis à la plateforme d'histologie de l'IRIC.

Brièvement, les cassettes sont immergées successivement dans différentes solutions pour déshydrater les tissus et les inclure en paraffine. Une fois inclus, les tissus sont coupés de façon sériée en coupe de 5 µm d'épaisseur et une coupe représentative est déposée sur une lame. Les lames sont alors colorées d'une part par la coloration d'hématoxyline et éosine, d'autre part par la coloration de Trichrome de Masson. Une fois colorées les lames sont transmises au docteur Bich Hong Nguyen au CHUM afin d'analyser en aveugle les colorations et d'établir le score MÉTAVIR qui mesure le taux de nécrose, d'inflammation et de fibrose.

Mesure du contenu en hydroxyproline

En parallèle du prélèvement de foie pour l'histologie, un deuxième prélèvement de foie juxtaposant le premier est réalisé et instantanément congelé avec de la glace sèche dans une solution d'isobutanol et conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant analyse.

La mesure du contenu en hydroxyproline est réalisée avec un kit colorimétrique obtenu auprès de Abcam, # de catalogue ab222941. Le jour de l'analyse, les échantillons de foie sont décongelés sur de la glace puis disséqués. Des morceaux de tissus d'environ 50 mg sont transférés dans des tubes Eppendorf à fond rond, contenant un volume équivalent à 100 μl d'eau distillée pour 10 mg de tissu. Les échantillons sont alors minutieusement homogénéisés avec un homogénéiseur de Dounce puis soniqués 2 minutes (15 secondes de pulse et 15 secondes de latence). Une fois parfaitement homogénéisé, 100 μl de l'homogénat est transféré dans des tubes en polypropylène, 100 μl de NaOH 10 M fraîchement préparés est ajouté aux 100 μl d'homogénat pour lyser le tissu, les tubes sont robustement fermés avec un bouchon à visser et incubés pendant au moins 60 minutes à $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suivant la lyse alcaline, les tubes sont placés sur la glace, une fois refroidis 100 μl de HCl 10 M est ajouté pour neutraliser la solution. Les tubes sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 10 000 G afin de collecter le surnageant dans de nouveaux tubes gardés sur la glace. En parallèle, des dilutions en série d'une solution d'hydroxyproline standard sont réalisées pour établir la courbe de calibration (0 μg , 0,2 μg , 0,4 μg , 0,6 μg , 0,8 μg et 1 μg d'hydroxyproline finale par puit). Tous les échantillons, homogénat de foie ou les standards d'hydroxyproline sont préparés ensemble, 10 μl de chaque sont déposés dans une plaque 96 puits. Tous les échantillons sont réalisés en triplicata. Les échantillons sont incubés à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à évaporation totale. Suivant l'évaporation, une formation cristalline se forme au fond des puits de la plaque et est dissoute par 100 μl de réactif d'oxydation préparé extemporanément sous agitation constante pendant 20 minutes à température ambiante. Le réactif d'oxydation comprend par échantillon 6 μl de chloramine T concentré et de 94 μl de tampon d'oxydation. La réaction se poursuit en ajoutant 50 μl de réactif de développement dans les puits et en incubant la plaque pendant 5 minutes à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalement, 50 μl de DMAB concentré est ajouté dans les puits, la plaque est scellée avec un adhésif et incubée pendant 45 minutes à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dans les 20 minutes, l'absorbance de chaque puits est mesurée dans un lecteur

de microplaque à une densité optique de 560 nm. Le contenu en hydroxyproline dans les échantillons de foie est alors calculé contre la courbe de calibration.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism GraphPad 8 pour Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Une différence significative a été systématiquement reportée pour $p < 0,05$.

Les analyses de survie sont réalisées par comparaison des courbes de survie et test de Log-rank de Mantel et Cox. Quand une différence significative est observée, un test de comparaison multiple adapté de la méthode Bonferonni est réalisé.

Les analyses de croissance mesurant le poids ont été réalisées pour le groupe d'une semaine par test de t multiples pour chaque jour. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$. Pour les groupes trois et cinq semaines, une analyse Two-Way ANOVA est réalisée avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (vs SHAM-VEH) ou # (vs BDL-VEH) $p < 0,05$. Les analyses de consommation de nourriture ont été réalisées pour le groupe d'une semaine par test de t unilatéral et correction de Welch. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec *** $p < 0,001$. Pour les groupes trois et cinq semaines, une analyse Two-Way ANOVA est réalisée avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (vs SHAM-VEH) $p < 0,05$; ** ou ## (vs BDL-VEH) $< 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les biomarqueurs hépatiques et l'hydroxyproline sont analysés pour le groupe d'une semaine par test de t unilatéral et correction de Welch. Les résultats sont exprimés par une boîte à moustaches en violon montrant chaque point avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. Pour les groupes trois et cinq semaines, une analyse One-Way ANOVA est réalisée avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés par une boîte à moustaches en violon montrant chaque point avec * (vs SHAM-VEH) ou # (vs BDL-VEH) $p < 0,05$; ** ou ## $< 0,01$; *** $p < 0,001$. Une autre manière d'analyser ces données fut de comparer le même paramètre

dans un même traitement au cours du temps. Les résultats sont alors analysés par Two-Way ANOVA et test de comparaison multiple de Tukey avec. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

L'analyse des points aberrants a été réalisée par méthode ROUT, $Q = 10\%$. Les points identifiés comme aberrants sont systématiquement retirés de l'analyse.

Résultats

Une augmentation anormale de la mortalité en fin de modèle nous oblige à redéfinir le modèle

L'analyse de la survie des animaux de tous les groupes expérimentaux et pour tous les traitements a été réalisée (Figure 14).

Tous les animaux ont survécu aux chirurgies et ont récupéré normalement (Figure 14a). Aucune mortalité n'est observée ni pour les animaux sacrifiés après une semaine (Figure 14b), ni pour les animaux sacrifiés après trois semaines (Figure 14c). Cependant, à partir de la troisième semaine, les animaux qui devaient poursuivre le modèle jusqu'à cinq semaines ont commencé à montrer une mortalité anormalement élevée par rapport à l'expérience du laboratoire (données non publiées) avec ce modèle pour lequel nous observons généralement en moyenne seulement 10% de mortalité en fin de modèle. Cette mortalité élevée s'observe notamment entre la quatrième et la cinquième semaine dans les traitements OCA, UDCA et VEH. Ceci nous a contraints à redéfinir notre modèle que nous voulions initialement porter à cinq semaines. Nous avons ainsi décidé de sacrifier les animaux qui devaient atteindre cinq semaines au bout de quatre semaines (Figure 14d). Les animaux qui avaient déjà atteint et dépassé quatre semaines furent sacrifiés et exclus des analyses. Cela a été décidé dans le but de conserver un nombre d'animaux suffisant et homogène pour le reste des analyses. Nous étions d'autant plus inquiets de pouvoir garder certains animaux dans le groupe traités avec OCA compte tenu de leur mortalité croissante à partir de trois semaines. Cette mortalité élevée observée dans le groupe BDL-VEH, nous laisse à penser que le véhicule utilisé (huile de maïs et DMSO) potentialise l'atteinte hépatique. De ce fait la temporalité des groupes conservée pour cette étude est : une semaine, trois semaines et quatre semaines.

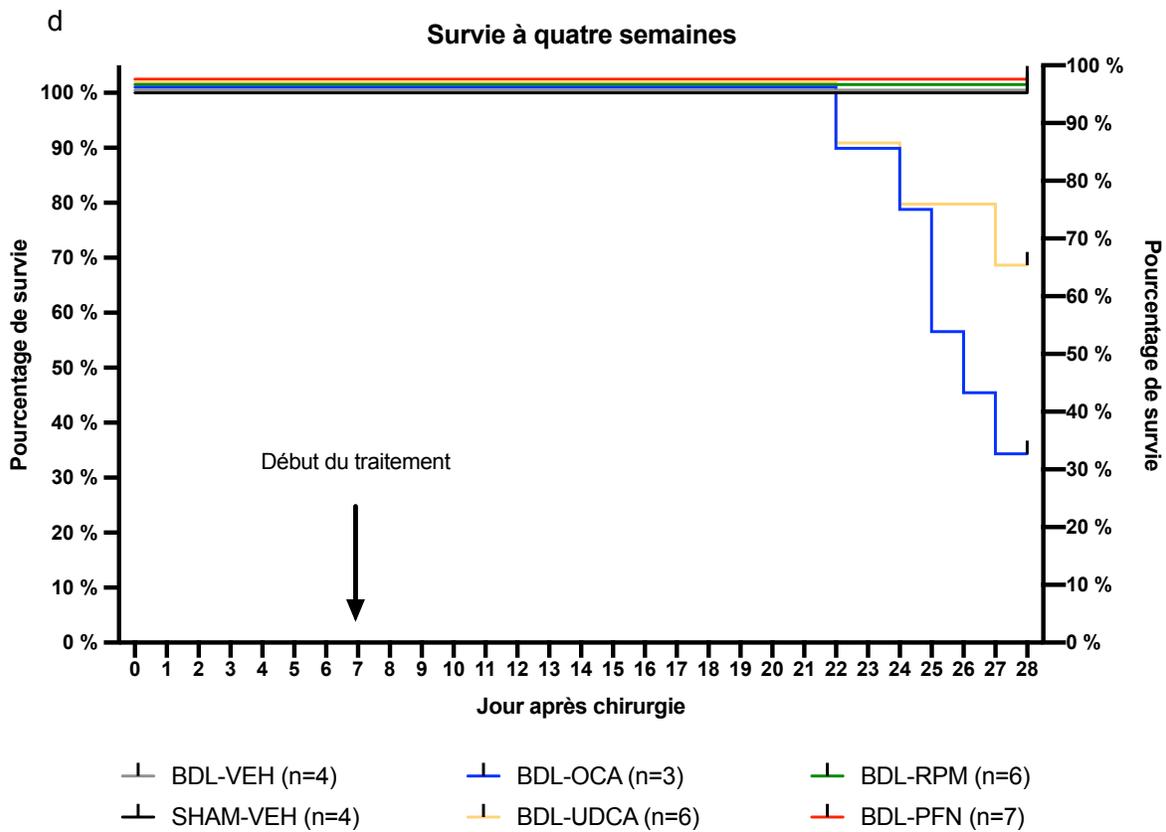


Figure 14. Analyse de survie dans les différents groupes expérimentaux.

a. Courbe de survie de la cohorte globale pour l'entièreté de la durée du modèle jusqu'à cinq semaines. Le tableau en dessous du graphique montre l'évolution du nombre d'animaux dans les différents traitements. b. c. d. Comparaison des courbes de survie dans les différents groupes expérimentaux par test de Log-rank de Mantel et Cox. b. Courbe de survie pour le groupe d'une semaine $\text{Chi}^2 = 0$, $p = \text{n.s.}$ c. Courbe de survie pour le groupe de trois semaines $\text{Chi}^2 = 0$, $p = \text{n.s.}$ d. Courbe de survie pour le groupe de quatre semaines $\text{Chi}^2 = 2,950$, $p < 0,01$. Une comparaison multiple adaptée de la méthode Bonferroni a été réalisée mais aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements.

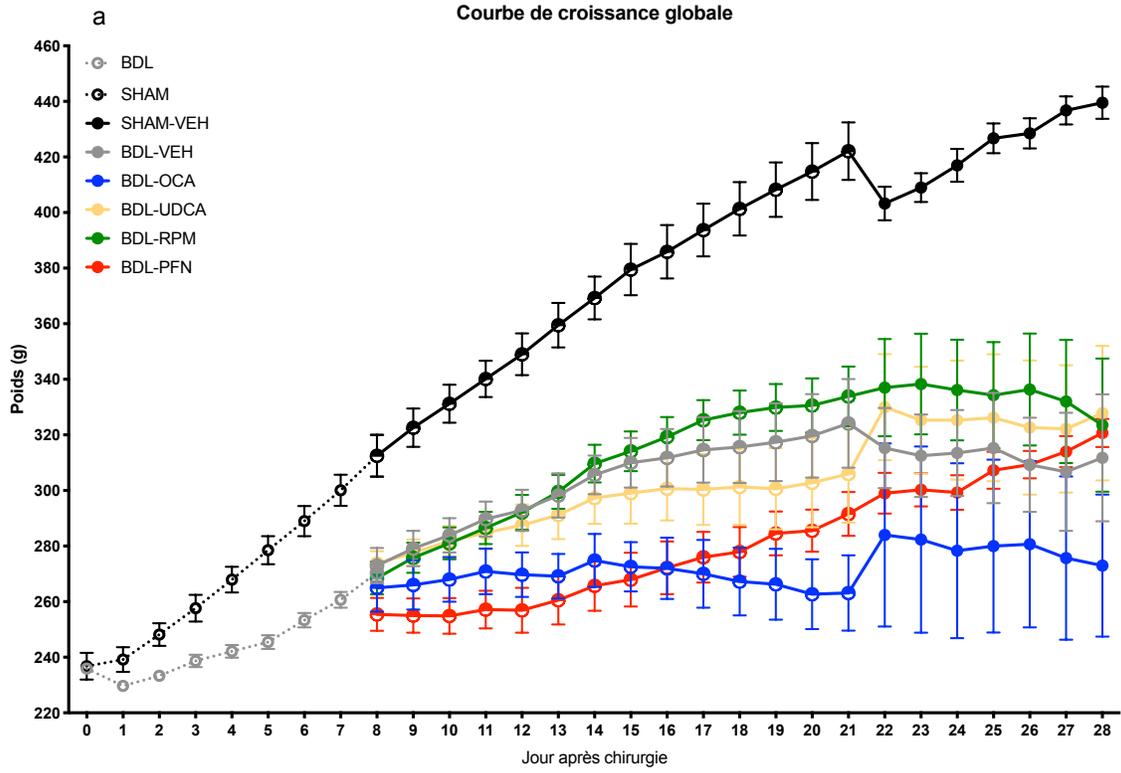
Les différents groupes BDL montrent une croissance globale et une consommation de nourriture globale diminuées par rapport aux animaux SHAM mais indifférenciées entre les animaux BDL

La croissance des animaux a été évaluée en relevant quotidiennement le poids des animaux (Figure 15).

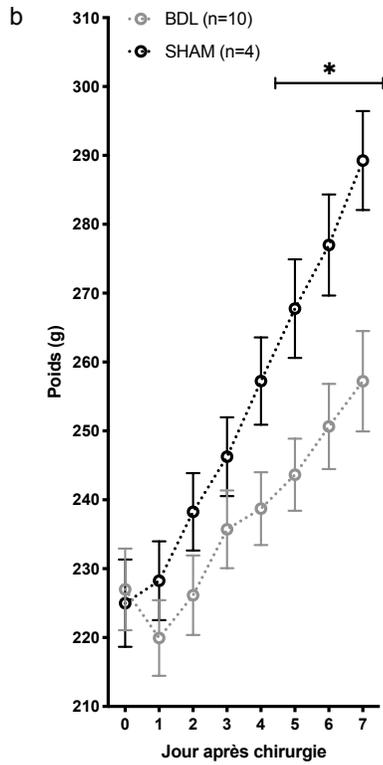
Comparativement aux animaux BDL, les animaux SHAM récupèrent plus rapidement après la chirurgie de ligature de la voie biliaire et, de façon attendue, croissent plus que leurs congénères le long du modèle dans les différents groupes expérimentaux (Figure 15b, 15c, 15d). Les animaux des groupes OCA, UDCA et PFN ont une croissance significativement ralentie comparativement aux animaux BDL d'après l'analyse de régression linéaire. Aucune différence n'est observée pour le groupe RPM (Figure 15c, 15d).

La consommation de nourriture a été relevée, pour chaque groupe expérimental (une semaine, trois semaines ou quatre semaines de modèle), toutes les semaines pour chaque cage de deux animaux et rapportée par animal (Figure 16).

En rapport avec les courbes de croissance, les consommations de nourriture montrent un plus grand appétit des animaux SHAM comparativement aux animaux BDL après la chirurgie de ligature de la voie biliaire (Figure 16b). Aucune différence significative n'a été observée dans l'analyse globale, bien que la consommation soit particulièrement diminuée dans le groupe BDL-OCA dans la dernière semaine du modèle (Figure 16a). Dans le groupe d'animaux continuant le modèle jusqu'à trois semaines (Figure 16c), on peut observer une diminution de l'appétit du groupe UDCA à la deuxième semaine post-chirurgie, par rapport aux animaux SHAM et BDL-VEH qui tend à se corriger à la troisième semaine. Cependant, leur valeur de poids est dans la norme des autres animaux BDL, de plus en valeur absolue, la moyenne de consommation de ces animaux reste dans l'intervalle des autres animaux BDL. À l'exception de la quatrième et dernière semaine du modèle dans le groupe d'animaux continuant le modèle jusqu'à quatre semaines, il n'y a pas de différence de consommation de nourriture entre les animaux SHAM et BDL (Figure 16d). Aucune différence significative n'a été observée par rapport aux traitements.



Courbe de croissance à une semaine



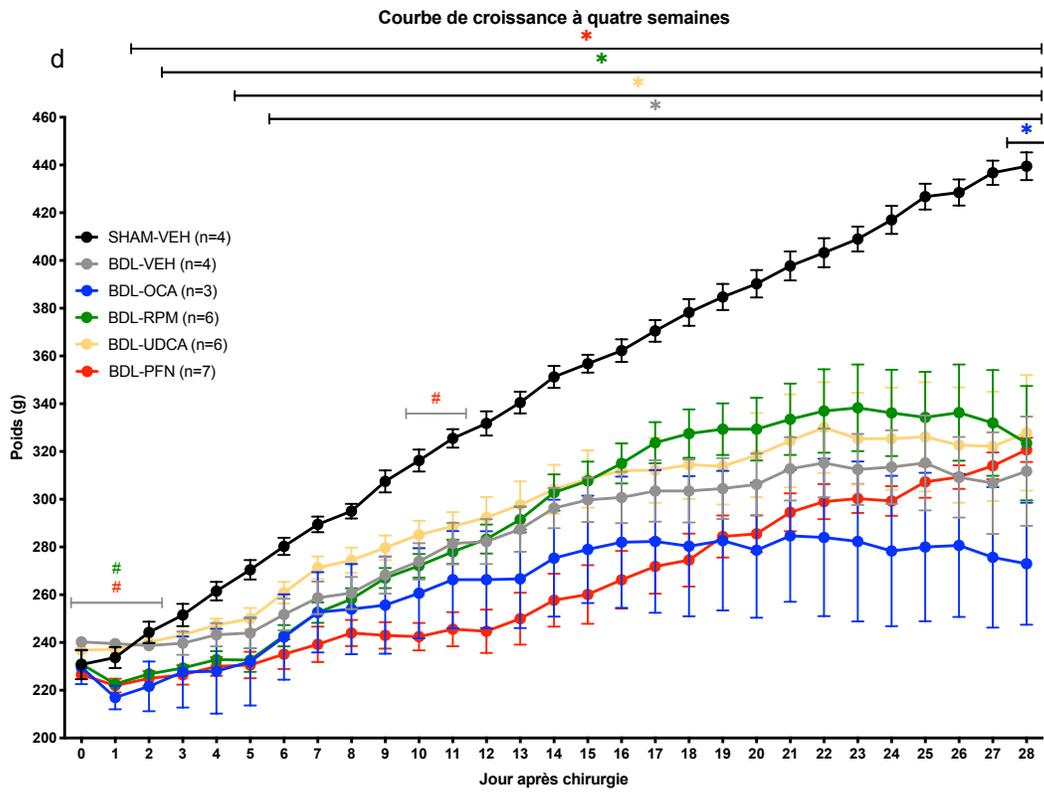
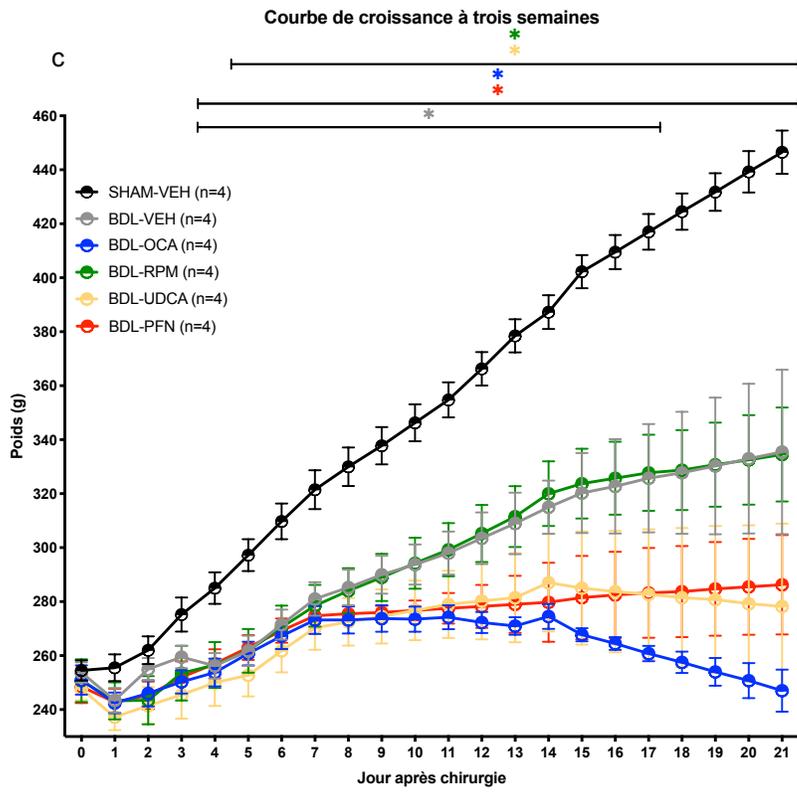
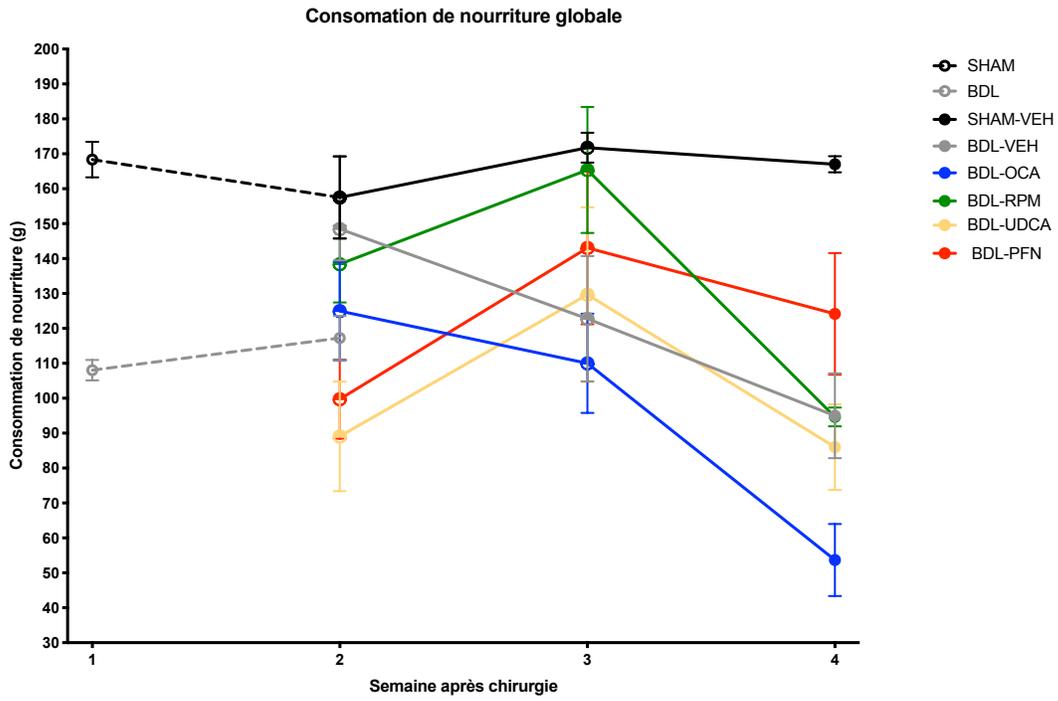


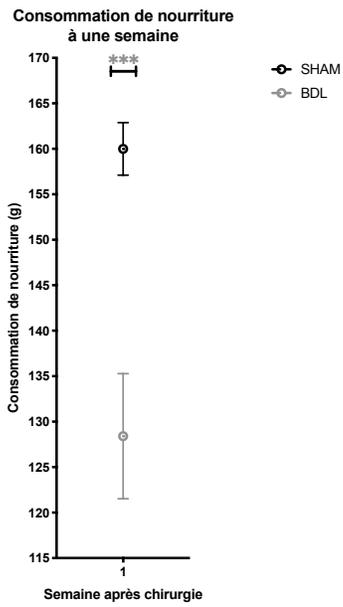
Figure 15. Analyse de la croissance globale (poids des animaux) dans les différents groupes expérimentaux.

a. Courbe de croissance de la cohorte globale pour l'entièreté de la cohorte d'animaux. b. Courbe de croissance du groupe une semaine analysée par test de t multiple pour chaque jour. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$. c. d. Courbes de croissance dans les groupes expérimentaux trois et quatre semaines analysées par Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (SHAM-VEH) ou # (BDL-VEH) $p < 0,05$.

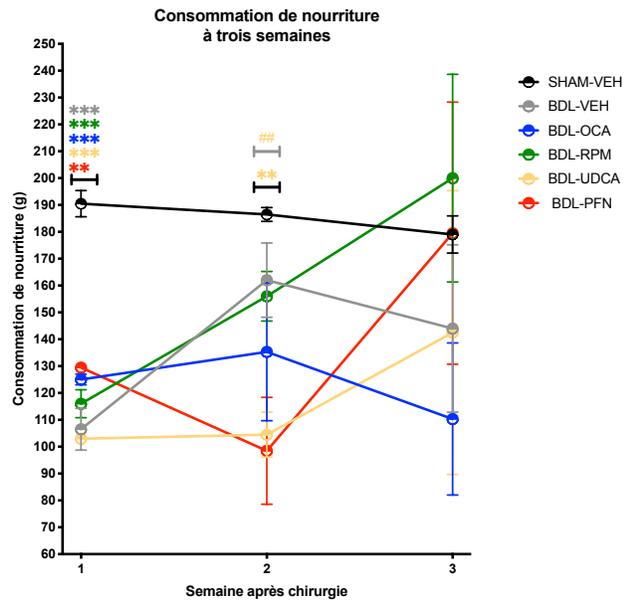
a



b



c



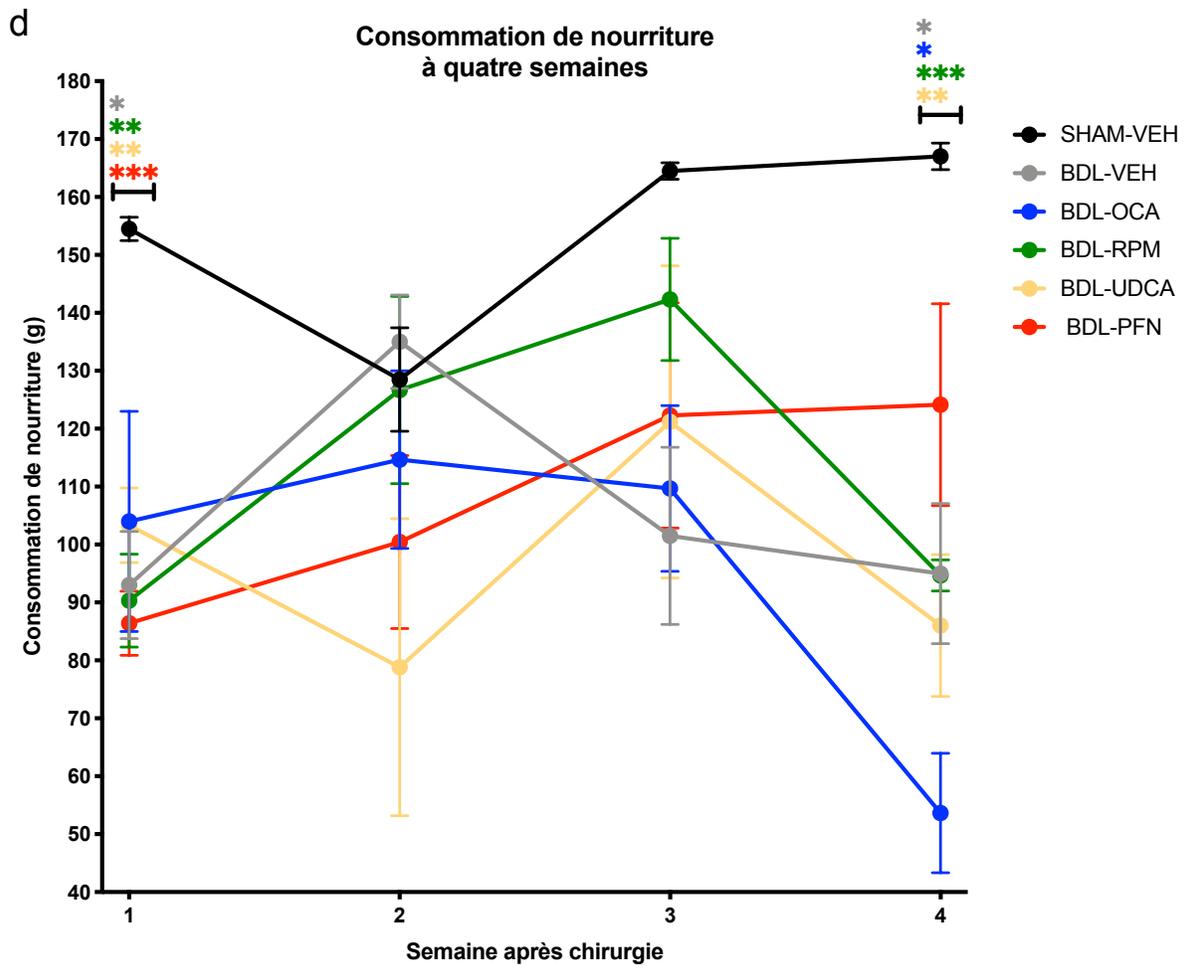


Figure 16. Consommation de nourriture globale dans les différents groupes expérimentaux.

a. Consommation de nourriture globale pour l'entièreté de la cohorte d'animaux. b. Courbe de consommation de nourriture à une semaine analysée par test de t multiple pour chaque semaine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$. c. d. Courbe de consommation de nourriture dans les groupes expérimentaux trois et quatre semaines analysées par Two-Way ANOVA avec correction de Geisser-Greenhouse et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (SHAM-VEH) ou # (BDL-VEH) $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les biomarqueurs de la fonction hépatique montrent l'établissement d'une atteinte hépatique sans amélioration significative apportée par les différents traitements

Les biomarqueurs de la fonction hépatique, albumine et bilirubine, ainsi que les enzymes hépatiques GGT, PAL, ALT et AST ont été mesurées dans les différents groupes expérimentaux d'une semaine (Figure 17), de trois semaines (Figure 18) et de quatre semaines (Figure 19).

Dès la fin de la première semaine, les animaux BDL montrent une dégradation de tous les paramètres biochimiques à l'exception des PAL (Figure 17a, 17b, 17c, 17d, 17e, 17f). Après trois et quatre semaines de traitement, les paramètres biochimiques présentent les caractéristiques d'une atteinte hépatique et correspondent à l'évolution de l'injure hépatique et l'établissement de la cirrhose.

Dans le groupe de trois semaines, l'albumine est toujours diminuée (Figure 18a), la bilirubine totale augmentée (Figure 18b) et les enzymes ALT et AST sont augmentées entre les animaux SHAM et BDL. Aucune différence n'a été observée entre les animaux SHAM et BDL pour les PAL et les GGT (Figure 18c et 18d). Aucune différence n'est observée entre les différents traitements pour la bilirubine totale, l'AST et l'ALT (Figure 18b, 18e, 18f). Le taux d'albumine est significativement réduit dans le groupe OCA comparativement aux animaux traités par le véhicule (Figure 18a).

Dans le groupe de quatre semaines, l'albumine est plus fortement diminuée (Figure 19a), la bilirubine totale augmentée (Figure 19b) et les enzymes PAL et ALT sont augmentés (Figure 19c, 19e) entre les animaux SHAM et BDL. Les animaux BDL traités par l'UDCA montrent un taux d'ALT plus augmenté et un taux de PAL plus diminué que les animaux traités par le véhicule (Figure 19c et 19e). Les animaux BDL traités par le PFN montrent un taux d'ALT et d'albumine plus augmentés que les animaux traités par le véhicule (Figure 19a et 19e).

Certains points aberrants ont été retirés en accord avec la méthodologie de l'analyse statistiques. Ces points peuvent être la résultante d'une difficulté technique (échantillon hémolysé, hyperlipidémique, cycle de congélation). Nous avons contrôlé pour savoir si ces points appartenaient au même animal et si cela corroboré avec le phénotype de ce dernier.

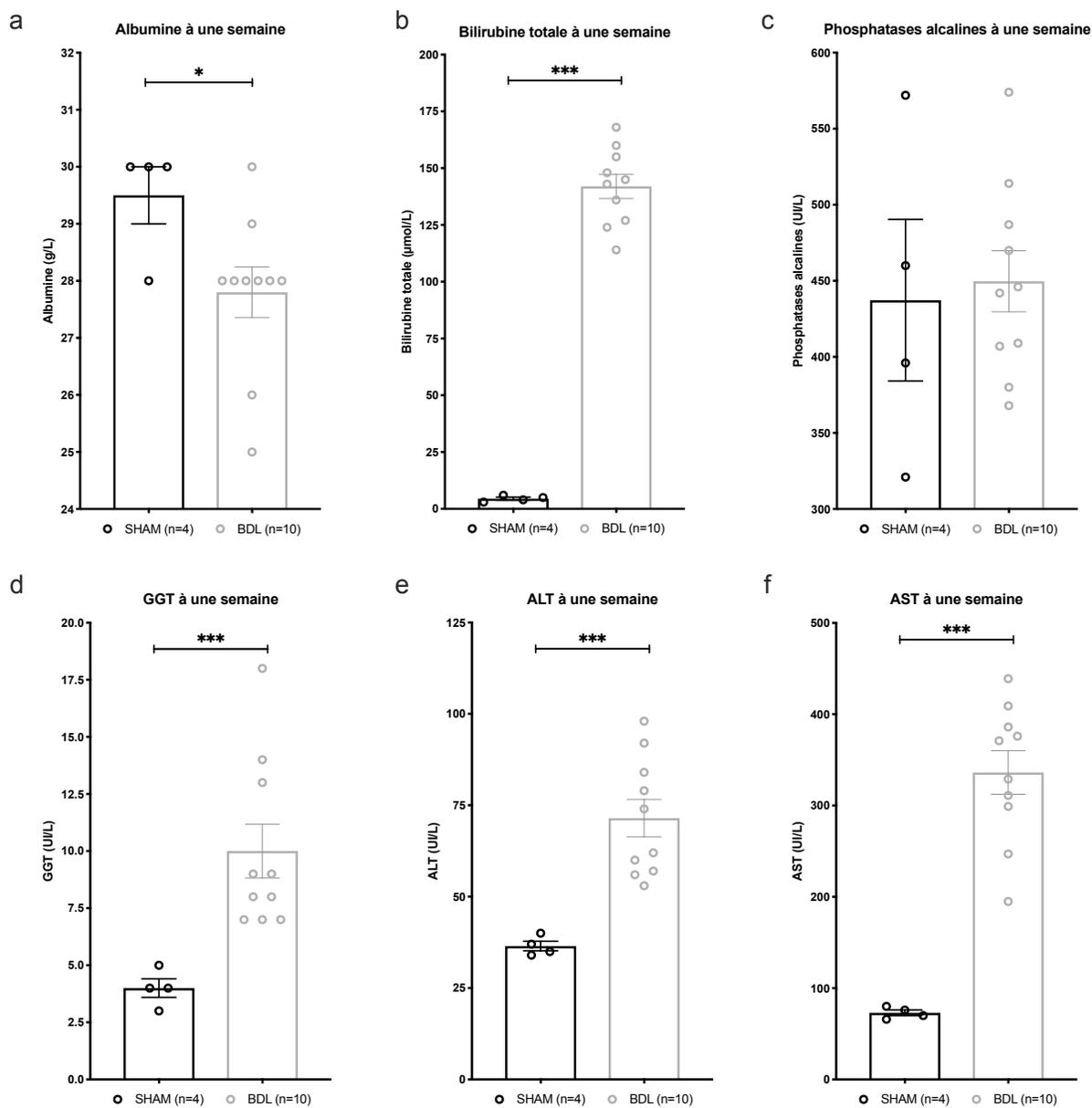
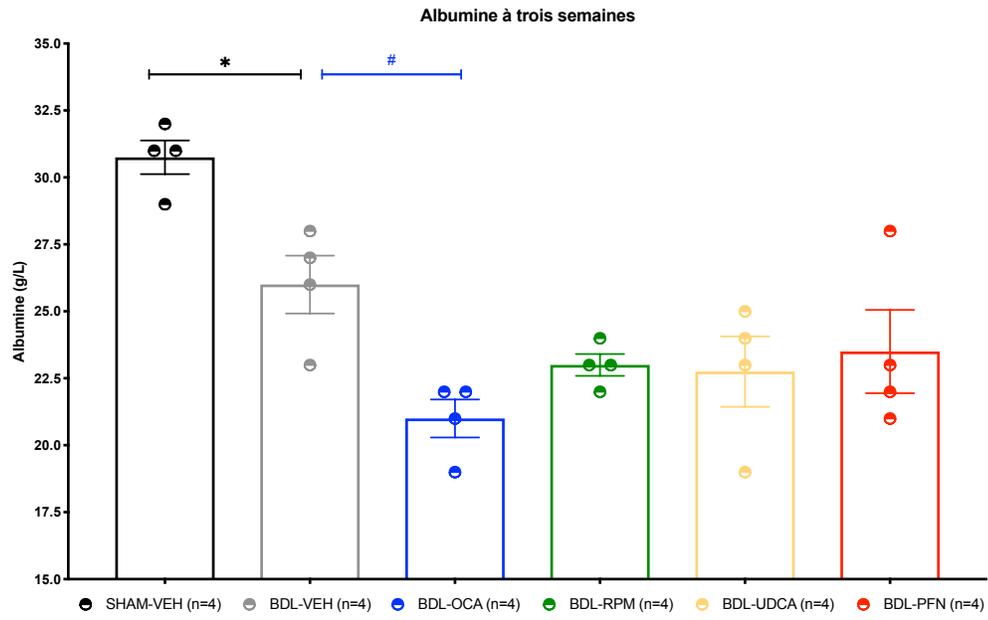


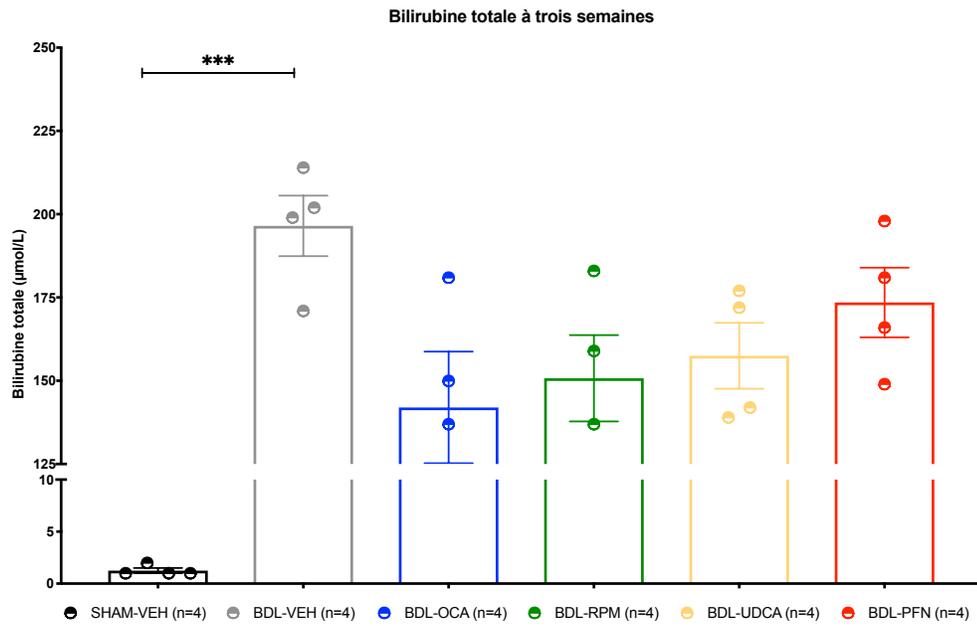
Figure 17. Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe d'une semaine.

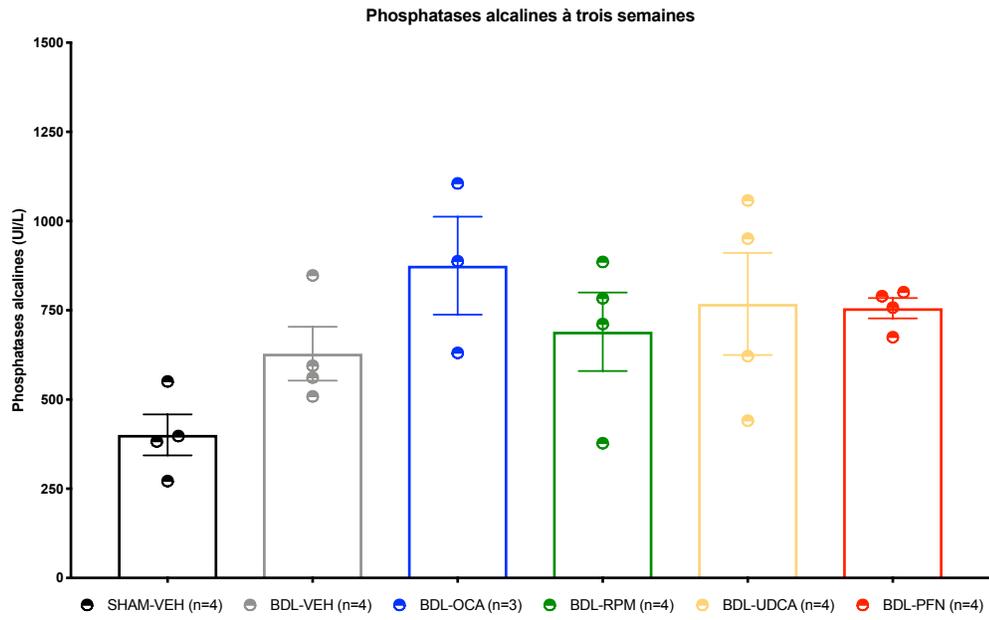
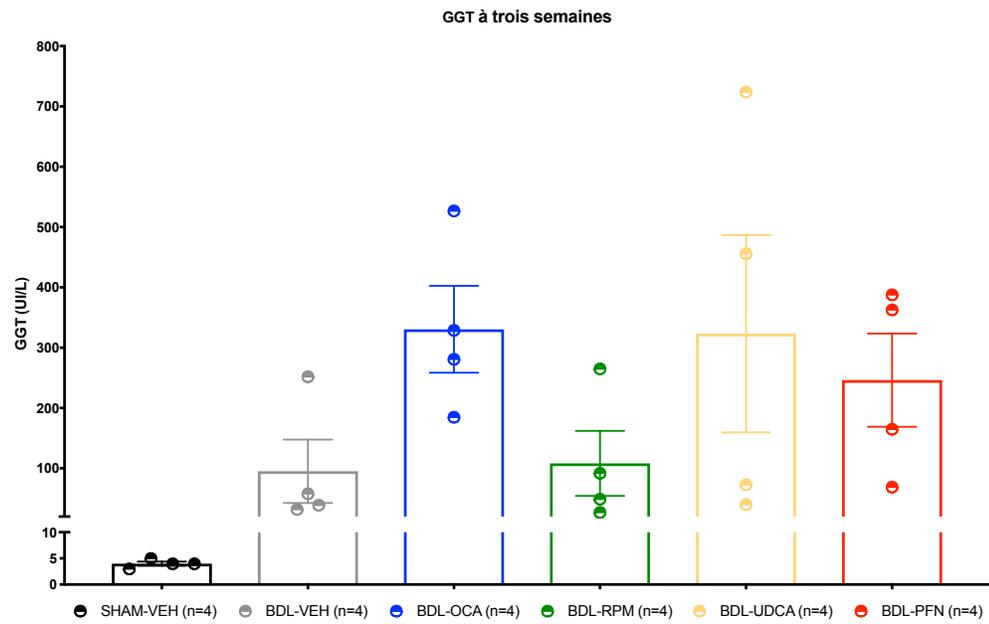
Mesure de l'albumine (a), de la bilirubine totale (b), des phosphatases alcalines (c), de la GGT (d), de l'ALT (e), de l'AST (f). Toutes les analyses ont été réalisées entre SHAM (n = 4) et BDL (n = 10) et consistent en un test de t unilatéral avec correction de Welch. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

a

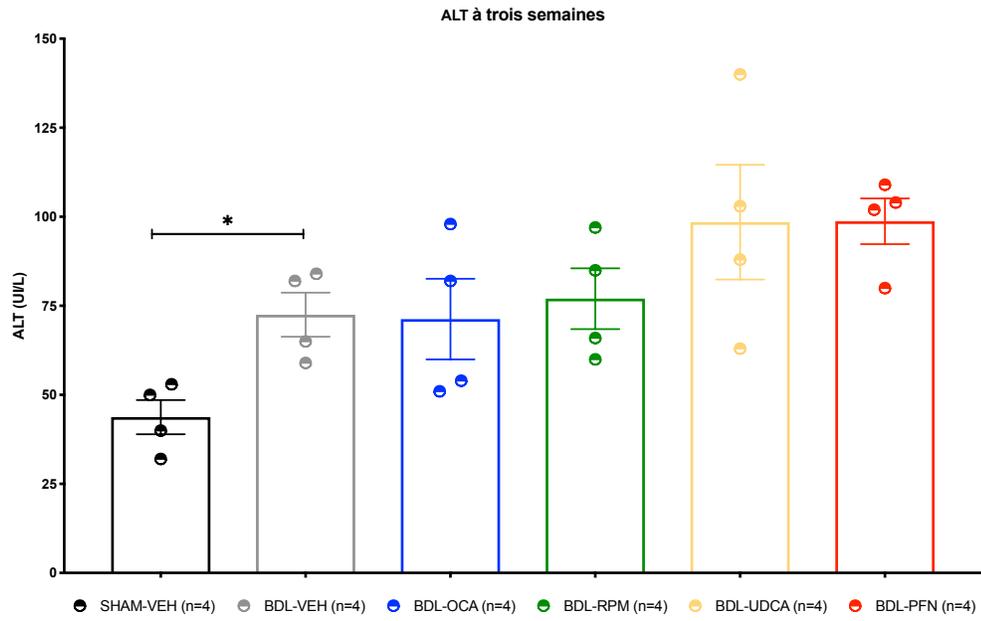


b



C**d**

e



f

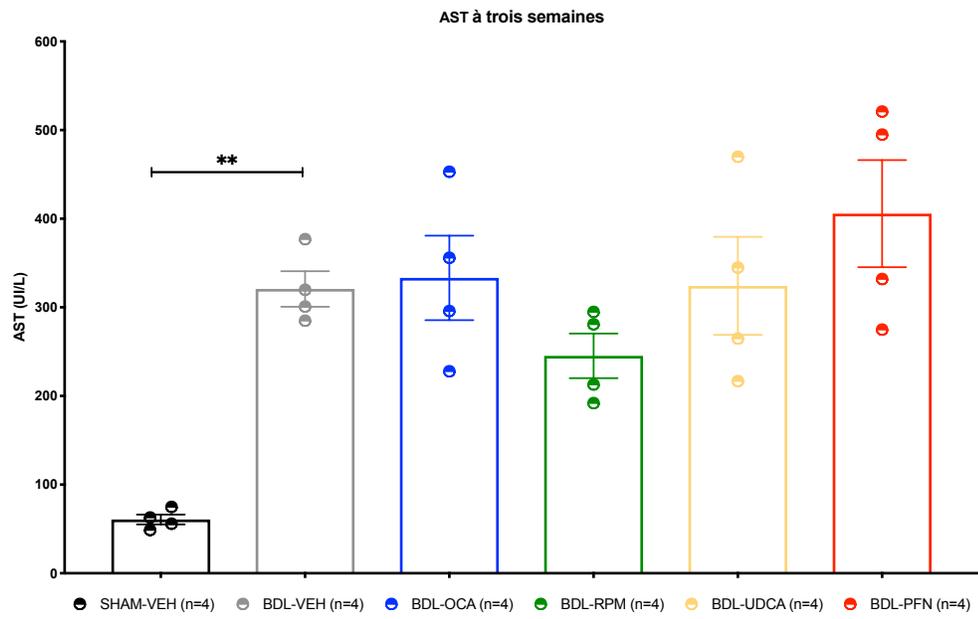
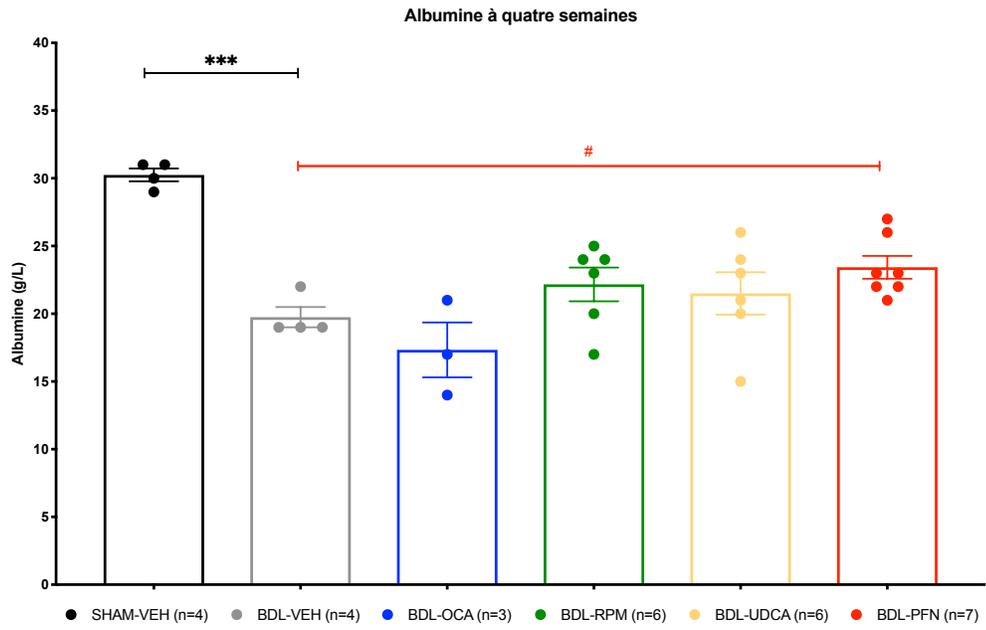


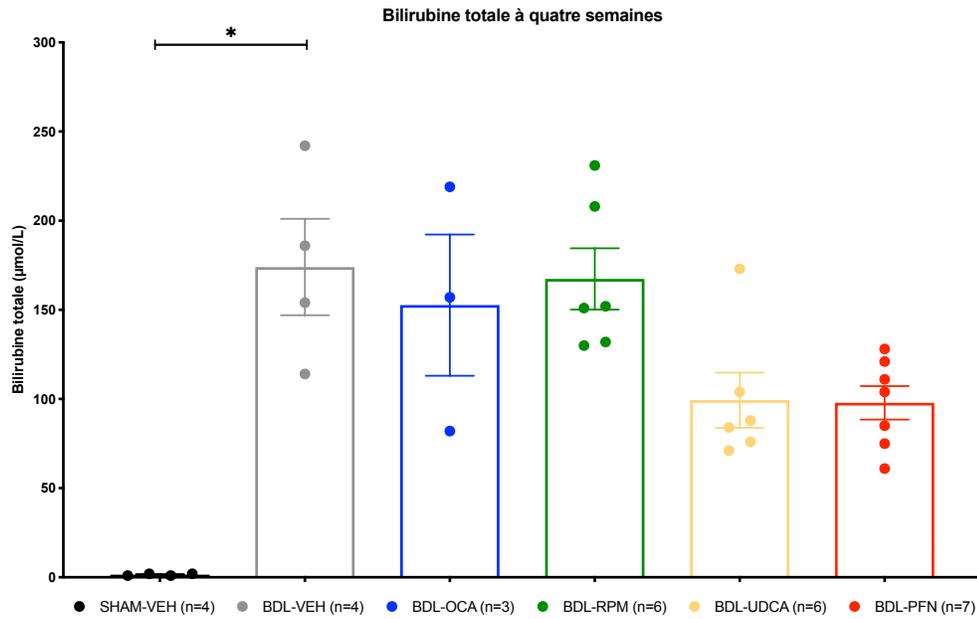
Figure 18. Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe de trois semaines.

Les différents traitements ont été analysés SHAM-VEH (n = 4), BDL-VEH (n = 4), BDL-OCA (n = 4), BDL-RPM (n = 4), BDL-UDCA (n = 4) et PFN (n = 4). Mesure de l'albumine (a), de la bilirubine totale (b), des phosphatases alcalines (c) (un point aberrant dans le groupe BDL-OCA a été exclu), de la GGT (d), de l'ALT (e), de l'AST (f). Toutes les analyses consistent en une analyse One-Way ANOVA réalisée avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (vs SHAM-VEH) ou # (vs BDL-VEH) $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $p < 0,001$.

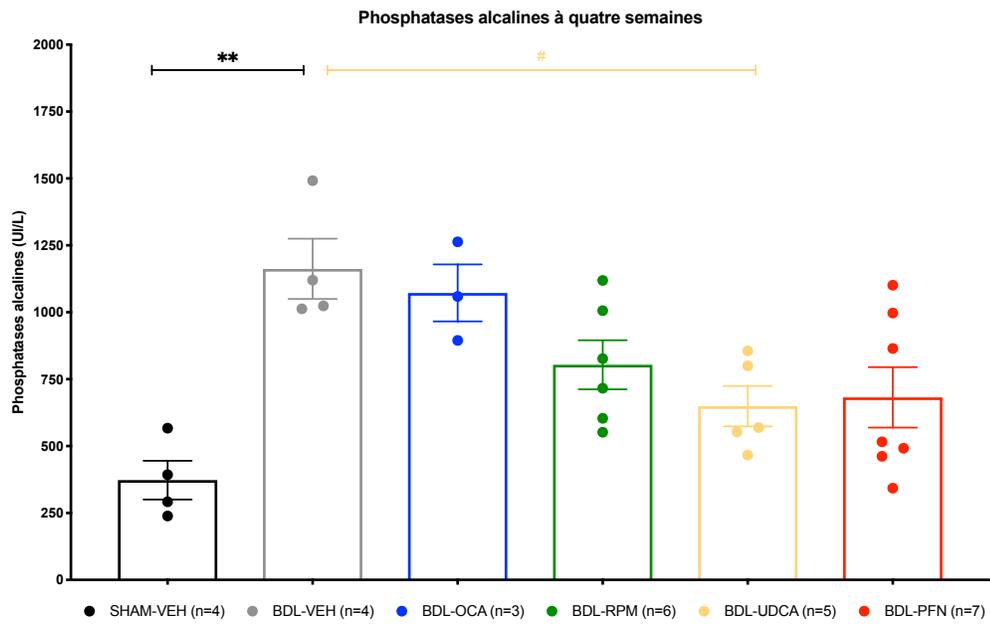
a



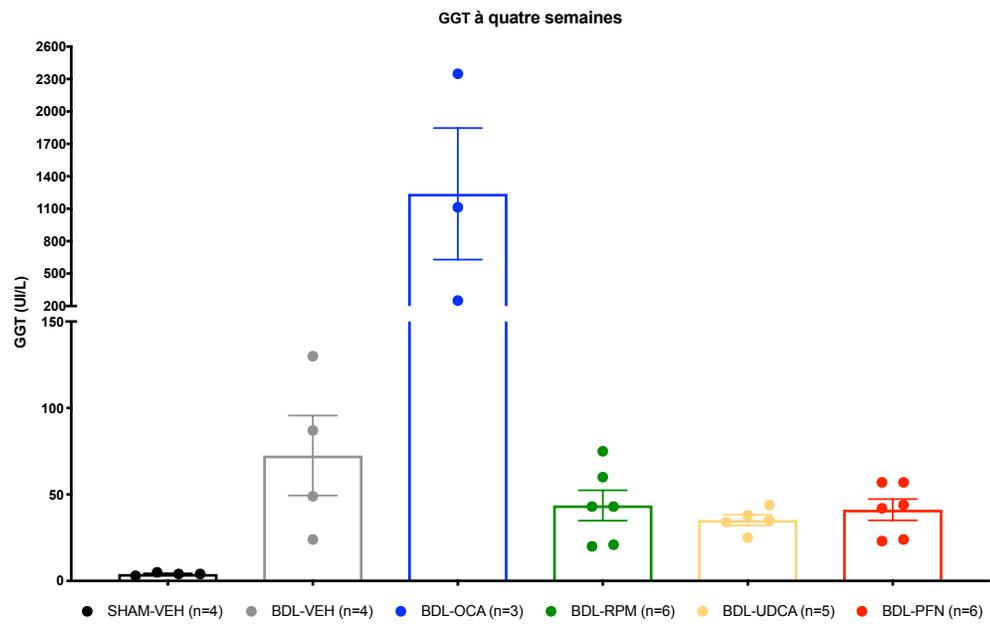
b



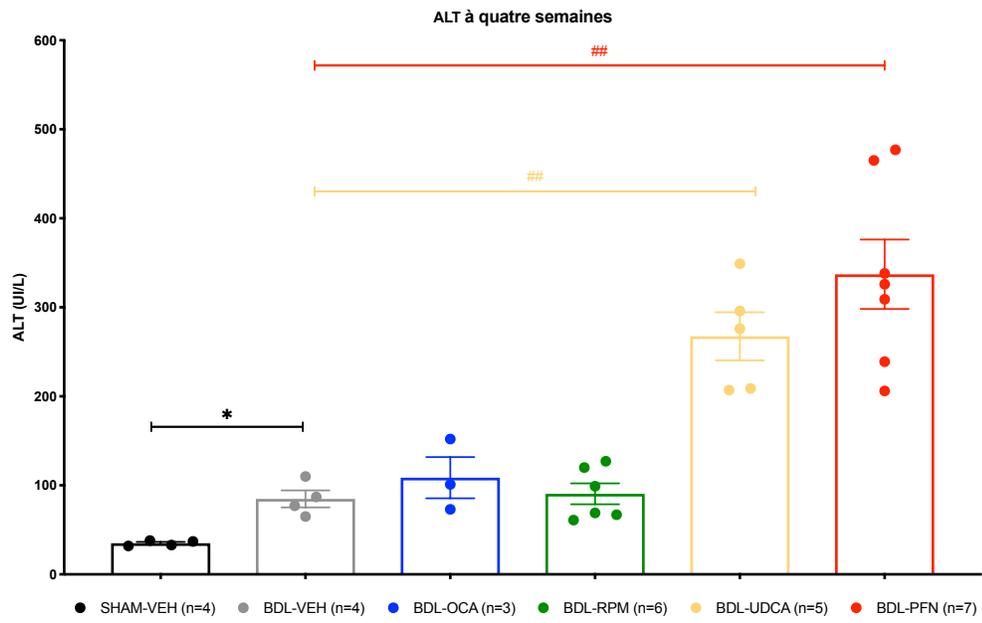
C



d



e



f

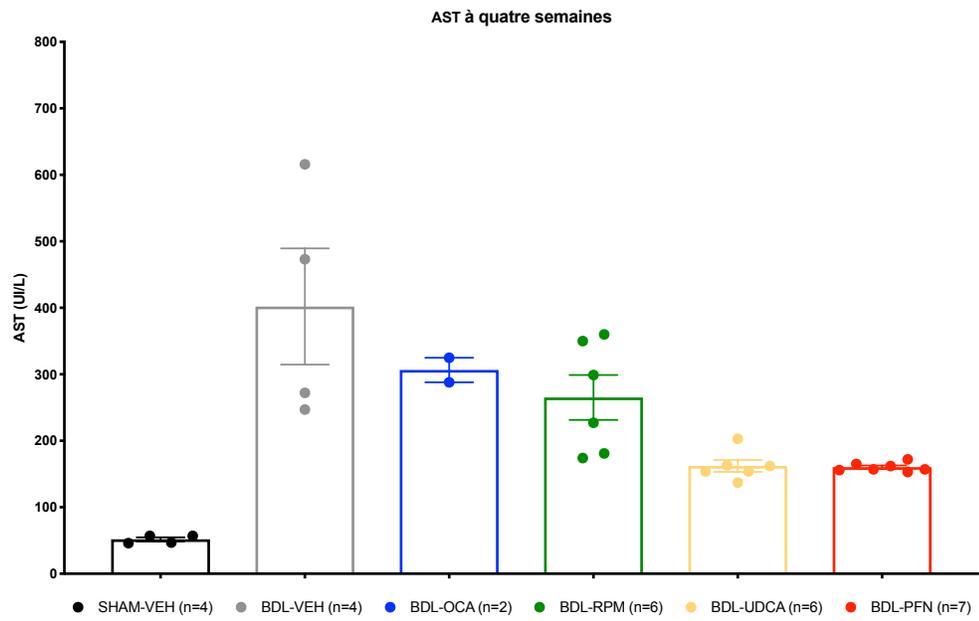


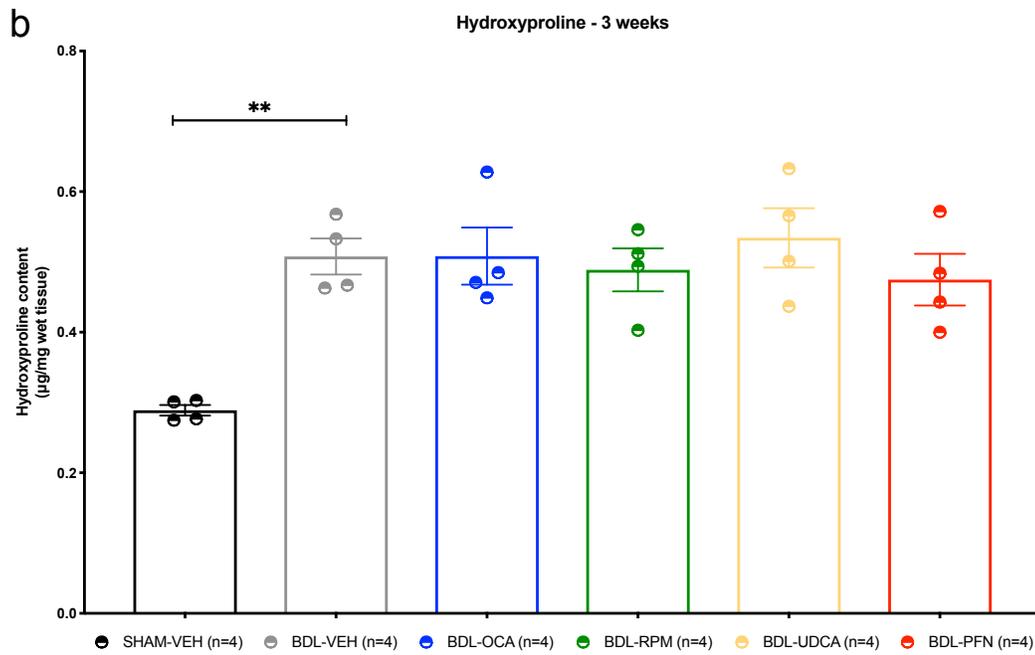
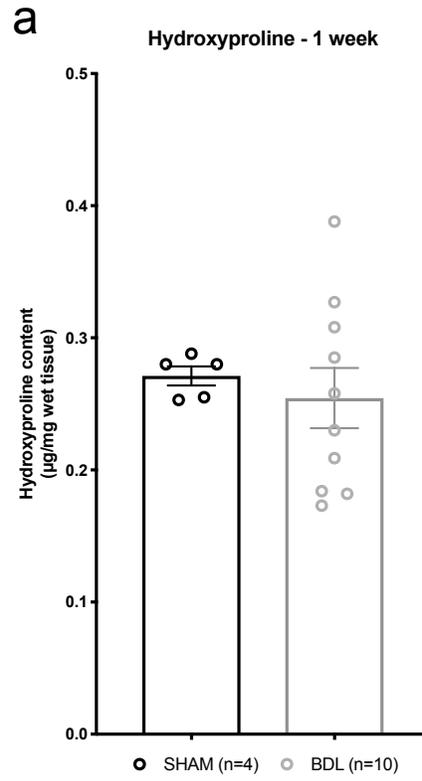
Figure 19. Mesure des biomarqueurs hépatiques dans le groupe de quatre semaines.

Les différents traitements ont été analysés SHAM-VEH (n = 4), BDL-VEH (n = 4), BDL-OCA (n = 3), BDL-RPM (n = 6), BDL-UDCA (n = 6) et PFN (n = 7). a. Mesure de l'albumine (a), de la bilirubine totale (b), des phosphatases alcalines (un point aberrant dans le groupe BDL-UDCA a été exclu), de la GGT (c) (un point aberrant dans le groupe BDL-UDCA et un point dans le groupe BDL-PFN ont été exclus), de l'ALT (e) (un point aberrant dans le groupe BDL-UDCA a été exclu), de l'AST (f) (un point aberrant dans le groupe BDL-OCA a été exclu). Toutes les analyses consistent en une analyse One-Way ANOVA est réalisée avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec * (vs SHAM-VEH) ou # (vs BDL-VEH) $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $p < 0,001$.

Les paramètres histologiques confirment l'établissement de la fibrose hépatique sans amélioration significative apportée par les différents traitements

Le contenu en hydroxyproline hépatique a été mesuré dans l'ensemble de la cohorte (Figure 20).

Le taux d'hydroxyproline n'est pas changé à la fin de la première semaine (Figure 20a) mais augmente progressivement au cours du temps (Figure 20b, 20c). Aucune différence significative n'a pu être observée en fonction des traitements.



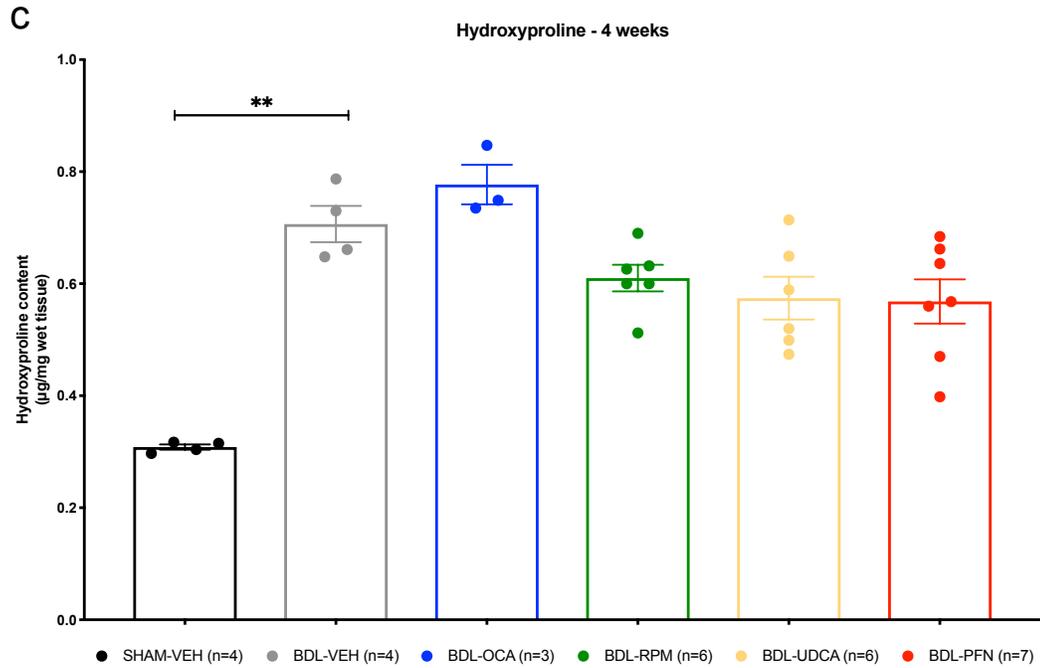


Figure 20. Mesure du contenu en hydroxyproline.

Les différents traitements ont été analysés SHAM-VEH (n = 4), BDL-VEH (n = 4), BDL-OCA (n = 4), BDL-RPM (n = 4), BDL-UDCA (n = 4) et PFN (n = 4). a. Mesure de l'hydroxyproline à une semaine (a), à trois semaines (b) et à quatre semaines (c). Toutes les analyses consistent en une analyse One-Way ANOVA réalisée avec correction de Brown-Forsythe et Welch et test de comparaison multiple de Dunnett T3 avec SHAM-VEH ou BDL-VEH comme groupe contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec ** (vs SHAM-VEH) $< 0,01$.

Le score MÉTAVIR pour tous les animaux a été établi (Tableaux 3) à partir des colorations d'hématoxyline et éosine (Figure 22) et du Trichrome de Masson (Figure 23). Après une semaine de chirurgie, on observe une faible fibrose dans le groupe BDL. À partir de trois semaines, la fibrose est pleinement évidente et se maintient à quatre semaines. Ce score témoigne de la progression de la fibrose entre les groupes expérimentaux.

Score	SHAM (n=4)	BDL (n=10)	SHAM-VEH (n=4)	BDL-VEH (n=4)	BDL-OCA (n=4)	BDL-RPM (n=4)	BDL-UDCA (n=4)	BDL-PFN (n=4)	SHAM-VEH (n=4)	BDL-VEH (n=4)	BDL-OCA (n=3)	BDL-RPM (n=6)	BDL-UDCA (n=6)	BDL-PFN (n=7)
Durée du modèle	Une semaine		Trois semaines						Quatre semaines					
F0	4/4	5/10	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	2/3	1/6	3/6	3/7
A0 0 %	3/4	10/10	3/4						4/4					
F1 Focale		1/10 4/10	1/4							2/4 1/4		3/6 1/6	2/6	2/7
A1 1 - 33 %	1/4		1/4											
F2 Focale											1/3	1/6 1/6		1/7 1/7
A2 34 - 66 %				1/4				1/4			1/3		1/6	2/7
F3 Focale													1/6	
A3 67 - 100 %				3/4	4/4	4/4	4/4	3/4		4/4	2/3	6/6	5/6	5/7
F4														

Tableau III. Score MÉTAVIR de l'ensemble de la cohorte.

A0 pour absence de nécrose et d'inflammation. F0 pour absence de fibrose. A1 pour présence minimale de nécrose et d'inflammation. F1 pour présence minimale de fibrose. A2 pour présence modérée de nécrose et d'inflammation. F2 pour présence modérée de fibrose. A3 pour présence sévère de nécrose et d'inflammation. F3 pour présence sévère de fibrose. F4 pour cirrhose.

Discussion et perspectives

Cette étude nous a permis de développer nos connaissances par rapport à notre modèle de ligature de la voie biliaire. L'OCA a montré une efficacité faible associée à une morbidité élevée. L'UDCA est également associé à une mortalité importante en fin de modèle. La RPM et la PFN semblent donner les meilleurs résultats en termes de survie.

Du fait de la mortalité élevée dans le groupe des animaux BDL-VEH (Figure 14), nous avons décidé de réduire la durée du modèle de cinq semaines à quatre semaines afin de collecter un nombre de sujets suffisant pour pouvoir tirer des conclusions de nos résultats. Tous les résultats sont donc exprimés dans les groupes expérimentaux suivants : une semaine, trois semaines et quatre semaines.

Les rats BDL-OCA tendent à croître moins que leurs congénères (Figure 15), ceci est en accord avec les données de survie et le phénotype que présentent ces animaux à mesure de l'avancée du modèle. Cependant, si l'on compare les résultats avec l'étude avec la rifaximine (Figure 4), on peut voir que les animaux dans ce projet ont moins d'appétit. Ceci peut être dû à l'utilisation d'huile de maïs comme véhicule. Bien que les animaux BDL aient le même appétit que les animaux SHAM, ces derniers croissent significativement plus que leurs congénères. Ceci peut s'expliquer par un défaut d'absorption des nutriments, notamment des lipides dans les animaux BDL (Minich et *al.*, 2000). La malabsorption des lipides est une conséquence secondaire de la ligature de la voie biliaire qui prévient la libération de bile dans le duodénum qui participe à l'émulsion du bol alimentaire (Cortens et *al.*, 2017) et peut nécessiter le support d'une nutrition parentérale (Gabe, 2013). La perte d'appétit des animaux BDL en fin de modèle peut tout à fait correspondre à l'évolution du phénotype secondaire à la cholestase hépatique. Les animaux du groupe BDL-RPM semblent montrer une meilleure croissance en parallèle à une plus grande consommation de nourriture que les autres animaux BDL, ceci peut s'expliquer par l'action de la rapamycine sur les récepteurs mTOR qui régulent la disponibilité des nutriments et la régulation de la balance énergétique (Cota et al. 2006).

Le catabolisme de la bilirubine est assuré par le foie. Avec la défaillance hépatocellulaire secondaire à l'inflammation induisant une destruction progressive des hépatocytes, ces derniers perdent leur capacité à conjuguer et excréter la bilirubine, ainsi le taux de bilirubine total tend à

augmenter naturellement. Cependant, après une semaine, les animaux BDL ne présentent pas encore de phénotype d'ictère avec jaunisse des muqueuses. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'un traitement de longue durée avec des composés anti-fibrotiques pourrait aider à maintenir la fonction des hépatocytes et contenir l'injure hépatique.

Les phosphatases alcalines sont normalement éliminées dans la bile, à jeun elles sont majoritairement présentes dans le foie, en postprandial une élévation des PAL est observée. Le taux de phosphatases alcalines augmente généralement dans les atteintes cholestatiques (Pichler *et al.*, 2016).

L'élévation de la GGT est une conséquence attendue de l'atteinte hépatobiliaire mais peut être également partiellement augmentée par la prise des traitements ou un régime hyper lipidémique (Pakravan *et al.*, 2009). Le taux élevé de GGT à quatre semaines est en contradiction avec certaines études cliniques de patients recevant de l'OCA (ICER, 2016). Il faut cependant noter que ces animaux exprimaient le plus fort phénotype de progression de l'atteinte hépatique. Une revue d'étude clinique a mis en évidence que l'OCA induit de façon dose dépendante des effets secondaires néfastes sur le foie (CDER, 2015). Ces effets secondaires pouvant être une élévation des marqueurs biochimiques, une décompensation de la cirrhose (aggravation de la jaunisse, de l'ascite et de la cirrhose biliaire primitive). La dose utilisée dans notre étude sur le rat traduirait une dose élevée chez l'Homme quand on rapporte les valeurs en mg/kg. Il est possible que l'effet relativement néfaste de l'OCA vu ici soit une conséquence de sa toxicité intrinsèque.

Les enzymes ALT et AST sont majoritairement présentes dans le tissu hépatique, leur élévation est également une conséquence de l'atteinte hépatique. L'ALT serait plus spécifique de l'atteinte hépatique que l'AST. Lors de la lyse de cellules hépatocytaires, ces enzymes sont libérées dans le sang. Ceci peut être secondaire au blocage des voies biliaires ou à la prise de médicaments. Une semaine après la chirurgie, les deux enzymes sont élevées dans les animaux BDL et sont normales chez les animaux SHAM. Trois semaines après la chirurgie, les deux enzymes sont augmentées dans le groupe BDL-VEH comparativement aux animaux SHAM-VEH. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les groupes d'animaux BDL traités. Quatre semaines après la chirurgie, l'AST n'est pas significativement augmentée dans les animaux BDL bien qu'en valeur absolue la valeur d'AST soit plus élevée chez les animaux BDL

que SHAM. L'ALT seule est augmentée de façon significative dans les animaux BDL-VEH. Les animaux BDL traités avec l'UDCA et le PFN ont une valeur d'ALT significativement plus élevée que les animaux BDL-VEH. Ces résultats traduisent la chronicité de l'injure hépatique. Le ratio AST/ALT peut indiquer une cholestase intra ($> 1,5$) ou extrahépatique ($< 1,5$). À la quatrième semaine de traitement, les animaux BDL traités avec le VEH, l'OCA et le RPM semblent indiquer comme attendu une cholestase intrahépatique alors que les animaux BDL traités avec l'UDCA et le PFN semblent présenter une cholestase extrahépatique. La condition extrahépatique est évidemment la ligature des voies biliaires, ce qui tend à faire penser que ces deux traitements (UDCA et PFN) ont résolu en partie la condition intrahépatique de la cholestase ou permis de contourner la condition extrahépatique de la cholestase (dérivation biliaire).

Globalement, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un effet thérapeutique prophylactique positif fort des composés anti-fibrotiques lors de l'initiation d'une cholestase hépatique par ligature de la voie biliaire chez le rat. Cette étude présente de nombreuses limitations :

D'une part la mortalité anormalement élevée des animaux en fin de modèle, nous fait nous interroger sur l'utilisation du DMSO voire de l'huile de maïs comme véhicule. En effet, le DMSO est un solvant polaire organique sulfuré aprotique qui ingéré facilite grandement la diffusion d'un composé à travers l'organisme. De ce fait, les traitements solubilisés dans le DMSO peuvent diffuser plus largement dans l'organisme que ce dont ils seraient originellement capables. Par ailleurs, le DMSO possède des propriétés immunosuppressives, anti-inflammatoires et antioxydantes et peut avoir un effet protecteur sur le foie en cas d'intoxication hépatique par le paracétamol. Cependant, dans un contexte de cholestase hépatique et de progression de la fibrose, les effets directs du DMSO ne sont pas parfaitement connus. L'huile de maïs peut également être en cause, dans notre protocole expérimental, tous les animaux sont gavés avec une dose de 5 ml/kg, il a été montré qu'à des doses plus élevées 10 ml/kg, l'huile de maïs a un effet négatif sur la fonction hépatique, le phénotype et la survie des animaux. La stéatose hépatique, accumulation de lipide dans le foie, est un facteur contribuant à la progression de la fibrose.

Après s'être rendu compte de l'augmentation non attendue et importante de mortalité chez les premiers animaux devant suivre le modèle jusqu'à cinq semaines, nous avons décidé

de réduire la durée du modèle à quatre semaines. Suite à cette décision, les animaux ayant dépassés quatre semaines de traitement ont été exclus des analyses afin de conserver un groupe consistant d'animaux traités quatre semaines. Ceci explique l'hétérogénéité et le faible nombre d'animaux dans le groupe de quatre semaines, qui dans certains cas diminue la puissance des tests statistiques et ne nous permet sans doute pas d'obtenir une différence significative.

Une limite inhérente au protocole expérimental est que tous les composés dissous dans l'huile de maïs peuvent être mal absorbés par les animaux BDL du fait de l'absence de bile dans le duodénum qui participe en temps normal à l'émulsion des lipides. Cette limitation aurait pu être contournée en mesurant la concentration des divers composés dans le plasma des animaux.

Une autre limitation technique est qu'il n'a pas été possible de réaliser les prélèvements sanguins sur des animaux à jeun. Or, ceci peut avoir un effet sur quelques paramètres biologiques. Ceci est d'autant plus important que les animaux les plus malades ont tendance à ne plus se nourrir et il n'est pas rare de sacrifier des animaux avec un estomac vide alors que certains animaux ont un sérum extrêmement lipémique. Nous considérons de standardiser tous nos prélèvements sur des animaux ayant jeûné au moins 4 heures.

Le score de MÉTAVIR ne donne globalement pas un score de fibrose très élevée dans notre modèle BDL alors que l'observation macroscopique du foie des animaux BDL montre une réelle progression de la fibrose (foie ictérique et induré).

Conclusion

Ces deux projets ont fourni des données importantes pour la compréhension de notre modèle de ligature de la voie biliaire.

Nous avons démontré que, dans les conditions expérimentales qui ont été utilisées, d'une part, que la rifaximine ou la combinaison de rifaximine et lactulose n'est pas supérieure au lactulose seul dans le traitement de l'encéphalopathie hépatique en tenant compte que le lactulose a globalement peu d'effet dans notre modèle. D'autre part, que les composés ayant un effet direct ou indirect sur la fibrose utilisés dans le projet Clementia ont peu d'effets hépatoprotecteurs vis-à-vis de la progression de la fibrose.

Concernant le projet rifaximine, il serait intéressant de faire une nouvelle étude avec une modélisation différente, notamment en augmentant le nombre d'animaux dans chaque groupe. Il serait possible d'augmenter la concentration de rifaximine puisque les animaux sont généralement moins sensibles et métabolisent plus rapidement les médicaments. Or, la dose utilisée dans le projet correspond à la dose administrée chez l'Homme. Toutefois, le lactulose étant une formulation commerciale déjà administrée au maximum de volume possible, il ne serait pas possible d'augmenter la dose. D'autre part, il serait pertinent de prendre avantage du modèle épisodique que nous avons développé dans lequel des épisodes manifestes d'HE sont provoqués chez des animaux BDL en injectant une dose i.p. d'ammoniac. Dans ce contexte, il serait intéressant de provoquer un ou plusieurs épisodes après la chirurgie de ligature de la voie biliaire et juste avant l'initiation du traitement. Ceci permettrait éventuellement d'avoir un contraste plus important entre animaux SHAM et animaux BDL et de fait pouvoir avoir une vision plus claire de l'effet des traitements. Il pourrait être envisagé d'essayer de provoquer un épisode à la fin du modèle afin de voir si les traitements ont un effet sur la résistance vis-à-vis de l'induction d'un épisode.

La cirrhose et les complications qui en découlent dont l'HE constitue une atteinte multifactorielle dont la gestion thérapeutique demande une approche sur plusieurs angles. Les recommandations de traitement pour les patients atteints d'HE préconisent du lactulose à une dose de 25 ml deux fois par jour et ajusté en fonction du nombre de selles (AASLD, 2014). En

cas d'HE récurrente les patients sont traités avec de la rifaximine 550 mg deux fois par jour en concomitance avec le lactulose (Bass, 2010). Les résultats de la présente étude vont dans le sens de ces recommandations n'ayant pas pu mettre en évidence un avantage à l'utilisation de la rifaximine seule ou de la combinaison rifaximine et lactulose en comparaison au lactulose seul, ceci malgré les limitations de l'étude.

Concernant le projet Clementia, le point le plus problématique réside dans l'utilisation du véhicule qui a clairement eu un effet par lui-même quand on regarde la survie du groupe BDL-VEH. Il pourrait être pertinent de tester certains de ces composés dissouts dans un véhicule différent (5 % éthanol). Il serait également intéressant de tester l'effet séparément du DMSO et de l'huile de maïs. Ce dernier véhicule serait tout à fait pertinent du fait de l'intérêt croissant pour les maladies du foie gras alors que nous développons présentement un modèle de stéatose hépatique. Les études cliniques de Nevens F. (Nevens et *al.*, 2016) et Hirschfield G. M. (Hirschfield et *al.*, 2015) ont montré une amélioration des paramètres biochimiques après une longue période de traitement par l'OCA (12 mois). Dans notre étude, les animaux sont traités sur une période maximale de trois semaines et nous n'observons pas d'amélioration au niveau des paramètres biologiques, ce qui pose la question de la durée du traitement. Cependant, il ne nous est pas possible d'allonger la durée du modèle au-delà de 5 semaines après chirurgie pour assurer une survie maximale des animaux. Certains composés utilisés dans cette étude ont potentiellement une cytotoxicité qui leur est propre. C'est notamment le cas de l'UDCA dont le métabolite principal, l'acide lithocholique, provoque l'apparition de calcul rénaux et la prolifération de canaux biliaire secondaires (Palmer et *al.*, 1966). Plusieurs études (Komiya et *al.*, 2017; Lopez-de la Mora et *al.*, 2015; Salazar-Montes et *al.*, 2008) indiquent un rôle important de la PFN dans la modulation de l'inflammation et de l'activité anti-oxydante via une diminution du TGF-beta, du collagène I α , de la sodium dismutase, de la catalase, de l'oxyde nitrique synthase inductible, du TNF- α et du PGDF. Ces paramètres seraient particulièrement intéressant à analyser dans la continuité de cette étude compte tenu de leur importance dans la progression de la cirrhose hépatique. Wu et *al.*, (Wu et *al.*, 2018) ont montré un effet positif du sirolimus sur les paramètres histologiques, biochimiques ainsi que sur l'activité motrice après deux semaines de traitement dans des rats BDL par injection intrapéritonéale. Cette voie d'administration pourrait expliquer la différence de résultat observé entre notre étude et de celle de Wu.

Cette étude confirme que la cirrhose et ses potentielles complications telles que l'encéphalopathie hépatique sont des atteintes multifactorielles nécessitant une prise en charge globale sur plusieurs fronts du patient.

Bibliographie

Abdel-Misih S. R. Z. and Bloomston M. (2010) 'Liver Anatomy', *Surgical Clinics of North America*, 90(4), pp. 643–53.

American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. (2014) 'Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease : 2014 Practice Guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Disease', *Journal of Hepatology*, 61, pp. 642–659.

Anroop B. N. and Jacob S. (2016) 'A simple practice guide for dose conversion between animals and human', *Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 7(2), pp. 27–31.

Bajaj J. S., Cordoba J., Mullen K. D., Amodio P., Shawcross D. L., Butterworth R. F. and Morgan M. Y. (2011) 'Review article: The design of clinical trials in hepatic encephalopathy—An International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33(7), pp. 739–747

Baskaran V., Murthy K. N., Mahadevamma, Vishwanatha S. and Lokesh B. R. (2001) 'Sub chronic toxicity studies of lactulose in rats', *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, pp. 441–446.

Bass N., Mullen K. and Sanyal A. (2010) 'Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy', *The New England journal of medicine*, 362, pp. 1071–81.

Bosoi C.R., Oliveira M.M., Ochoa-Sanchez R., Tremblay M., Ten Have G.A., Deutz N.E., Rose C.F. and Bemeur C. (2017) 'The bile duct ligated rat: A relevant model to study muscle mass loss in cirrhosis', *Metabolic Brain Disease*, 32, pp. 513–518.

Bosoi C.R., Zwingmann C., Marin H., Parent-Robitaille C., Huynh J., Tremblay M., and Rose C.F. (2014) 'Increased brain lactate is central to the development of brain edema in rats with chronic liver disease', *Journal of Hepatology*, 60, pp. 554–560.

Bosoi C.R., Yang X., Huynh J., Parent-Robitaille C., Jiang W., Tremblay M. and Rose C.F. (2012) 'Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure' *Free Radical Biology and Medicine*, 52(7), pp.1228-1235.

Butterworth R.F., Norenberg M.D., Felipe V., Ferenci P., Albrecht J., and Blei A.T. (2009) 'Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines' *Liver International*, 29, pp. 783–788.

Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Application 207999Orig1s00. Medical Review. Pp. 212–226.

Cheng J., Shah Y.M. and Gonzalez F.J. (2012) 'Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders', *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(6), pp. 323–330.

Corless J. K. and Middleton H. M. (1983) 'Normal Liver Function: A Basis for Understanding Hepatic Disease', *Archives of Internal Medicine*, 143(12), pp. 2291–2294.

Corstens M. N., Berton-Carabin C. C., de Vries R., Troost F. J., Masclee Ad A. M., and Schroën K. (2017) 'Food-grade micro-encapsulation systems that may induce satiety via delayed lipolysis : A review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), pp. 2218–2244.

Cota D., Proulx K., Blake Smith K. A., Kozma S. C., Thomas G., Woods S. C. and Seeley R. J. (2006) 'Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake', *Science*, 312(5775), pp. 927–930.

Crippa G., Cagnoni C., Castelli A., Concesi C., Girometta S., Pancotti D., Sverzellati E., Tacchini G., Pierfranceschi M. G. and Carrara G.C. (1995) 'Prolonged treatment with ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis', *Clinical Therapeutics*, 146(5), pp. 367–372.

Cudalbu C. and Taylor-Robinson S.D. (2019) 'Brain Edema in Chronic Hepatic Encephalopathy', *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 9(3), pp. 362–382.

Detlef S. and Nezam H. A. (2008) 'Liver Cirrhosis', *Lancet*, 371(9615), pp. 838–851.

Ferenci P., Lockwo, A., Mullen K., Tarter R., Weissenborn K. and Blei A. T. (2002) 'Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998', *Hepatology*, 35(3), pp. 716–721.

Gabe S. M. (2013) 'Lipids and liver dysfunction in patients receiving parenteral nutrition', *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(2), pp. 150–155.

Toda G., Ishibashi H., Onishi S., Okanoue T., Onji M., Kako M., Kaneko S., Kamimura T., Kawasaki H., Sata M., Suzuki K., Tanaka N., Hayashi N., Makino I. and Watanabe S. (2011) 'Prolonged treatment with ursodeoxycholic acid of patients with primary biliary cirrhosis and their clinical course —Study Group for Urso-PBC Special Survey', *Clinical Therapeutics*, 52, pp. 584–601.

Grant D.M. (1991) 'Detoxification Pathways in the Liver, in: *Journal of Inherited Metabolic Disease*', Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 421–430.

Groeneweg M., Quero J. C., De Bruijn I., Hartmann I. J. C., Essink-Bot M. L., Hop W. C. J. and Schalm, S. W. (1998) 'Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning', *Hepatology*, 28(1), pp. 45–49.

Han T. S. and Lean M. E. (2016) 'A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease', *JRSM Cardiovascular Disease*, 5, pp. 1–13.

Heidari R., Jamshidzadeh A., Ghanbarinejad V., Ommati M.M., and Niknahad H. (2018) 'Taurine supplementation abates cirrhosis-associated locomotor dysfunction', *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4, 72–82.

Hirschfield G. M., Mason A., Luketic V., Lindor K., Gordon S. C., Mayo M., Kowdley K. V., Vincent C., Bodhenheimer H. C. Jr., Parés A., Trauner M., Marschall H. U., Adorini L., Sciacca C., Beecher-Jones T., Castelloe E., Böhm O., Shapiro D. (2015) 'efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid', *Gastroenterology*, 148(4), pp. 751–761.

Huard G., Vincent C., and Bémour C. (2016) 'Le bilan hépatique : comment l'interpréter pour une intervention nutritionnelle optimale?' *Nutrition, Science en Évolution*, 14, pp. 13–16.

Ishibashi H., Nakamura M., Komori A., Migita K. and Shimoda S. (2009) 'Liver architecture, cell function, and disease', *Seminars in Immunopathology*, 31(3), pp. 399–409.

Jones E.A. (2002) 'Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy', *Metabolic Brain Disease*. pp. 275–281.

Jover R., Rodrigo R., Felipe V., Insausti R., Sáez-Valero J., García-Ayllón M. S., Suárez I., Candela A., Compañ A., Esteban A., Cauli O., Ausó E., Rodriguez E., Guitérrez A., Girona E., Erceg S., Berbel P. and Pérez-Mateo M. (2006) 'Brain edema and inflammatory activation

in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis', *Hepatology* 43, 1257–1266.

Komiya C., Tanaka M., Tsuchiya K., Shimazu N., Mori K., Furuke S., Miyachi Y., Shiba K., Yamaguchi S., Ikeda K., Ochi K., Nakabayashi K., Hata K. I., Itoh M., Suganami T. and Ogawa Y. (2017) 'Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis', *Scientific Reports*, 17(7), 44754.

Kumar A., Davuluri G., Silva R. N. E., Engelen M. P. K. J., Ten Have G. A. M., Prayson R., Deutz N. E. P. and Dasarathy S. (2017) 'Ammonia lowering reverses sarcopenia of cirrhosis by restoring skeletal muscle proteostasis', *Hepatology*, 65(6), pp. 2045–2058.

Liedtke C., Luedde T., Sauerbruch T., Scholten D., Streetz K., Tacke F., Tolba R., Trautwein C., Trebicka J. and Weiskirchen R. (2013) 'Experimental liver fibrosis research: Update on animal models, legal issues and translational aspects', *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 6(19), pp 1–24.

Lopez-de la Mora D. A., Sanchez-Roque C., Montoya-Buelna M., Sanchez-Enriquez S., Lucano-Landeros S., Macias-Berragan J. and Armendariz-Borunda J. (2015) 'Role and New Insights of Pirfenidone in Fibrotic Diseases', *International Journal of Medical Sciences*, 12(11), pp. 840-847.

Marmarou A, Poll W and Shulman K. B. H. (1978) 'A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema', *Journal of Neurosurgery*, 49(4), pp. 530–537.

Meredith G. L., Cansdell D., Willis J. A., MacLellan D. G., Cregan P. C. and Deane S. A. (2011) 'Emergency surgery: Measure, change and benefit', *Australian Journal of Advanced Nursing*, 28(4), pp. 68–74.

Mendes N. F., Mariotti F. F. N., de Andrade J. S., de Barros Viana M., Céspedes I. C., Nagaoka M. R., and Le Sueur-Maluf L. (2017) 'Lactulose decreases neuronal activation and attenuates motor behavioural deficits in hyperammonemic rats', *Metabolic Brain Disease* 32, 2073–2083.

Minich D. M., Havinga R., Stellaard F., Vonk R. J., Kuipers F. and Verkade H. J. (2000) 'Intestinal absorption and postabsorption metabolism of linoleic acid in rats with short-term bile

duct ligation', *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(6), pp. 1242–1248.

Mohamed H. E., Elswefy S. E., Rashed L. A., Younis N. N., Shaheen M. A. and Ghanim A. M. H. (2015) 'Cholestatic liver fibrosis in a rat model of bile duct ligation: Evaluating biochemical versus histopathological changes', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(6), pp. 349–354.

Morris S., Bilodeau M., Cooper C., Mackie D., Depew W., Villeneuve J.-P., Bain V., and Tarba R. (2013) 'Liver disease in Canada : a crisis in the making : an assessment of liver disease in Canada', Markham, Ontario : Canadian Liver Foundation.

Mumtaz K., Ahmed U. S., Abid S., Baig N., Hamid S. and Jafri W. (2010) 'Precipitating factors and the outcome of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis', *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 20(8), pp. 514–518.

Murray C. J. L. and Lopez A. D. (1997) 'Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study', *Lancet*, 349(9064), pp. 1498–1504.

Myers R.P., Krajden M., Bilodeau M., Kaita K., Marotta P., Peltekian K., Ramji A., Estes C., Razavi H., and Sherman M. (2014) 'Burden of disease and cost of chronic hepatitis C virus infection in Canada', *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28, pp. 243–250.

Nardone R., Taylor A. C., Höller Y., Brigo F., Lochner P. and Trinka E. (2016) 'Minimal hepatic encephalopathy: A review', *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, 111, pp. 1–12.

Nevens F., Andreone P., Mazzella G., Strasser S. I., Bowlus C., Invernizzi P., Drenth J. P., Pockros P. J., Regula J., Beuers U., Trauner M., Jones D. E., Floreani A., Hohenester S., Luketic V., Shiffman M., van Erpecum K. J., Vargas V., Vincent C., Hirschfield G. M., Shah H., Hansen B., Lindor K. D., Marschall H. U., Kowdley K. V., Hooshmand-Rad R., Marmon T., Sheeron S., Pencek R., MacConell L., Pruzanski M., Shapiro D. and POISE Study Group. (2016) 'A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis', *New England Journal of Medicine*, 375(7), pp. 631–643.

Ochoa-Sanchez R. and Rose C. F. (2018) 'Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease', *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, INASL, 8(3), pp. 262–271

Odena G., Miquel M., Serafin A., Galan A., Morillas R., Planas R. and Bartolí R. (2012) 'Rifaximin, but not growth factor 1, reduces brain edema in cirrhotic rats', *World Journal of Gastroenterology*, 18(17), pp. 2084–2091.

Pakravan N., Simpson K. J., Waring W. S., Bates C. M. and Bateman D. N. (2009) 'Renal injury at first presentation as a predictor for poor outcome in severe paracetamol poisoning referred to a liver transplant unit', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(2), pp. 163–168.

Patsenker E., Schneider V., Ledermann M., Saegesser H., Dorn C., Hellerbrand C. and Stickel F. (2011) 'Potent antifibrotic activity of mTOR inhibitors sirolimus and everolimus but not of cyclosporine A and tacrolimus in experimental liver fibrosis', *Journal of Hepatology*, *European Association for the Study of the Liver*, 55(2), pp. 388–398.

Palmer R. H. and Ruban Z. (1966). 'Production of bile hyperplasia and gallstones by lithocholic acid', *Journal of Clinical Investigation*, 45(8), pp. 1255–1267.

Pellicoro A., Ramachandran P., Iredale J.P., and Fallowfield J.A. (2014) 'Liver fibrosis and repair : immune regulation of wound healing in a solid organ', *Nature Review Immunology*, 14, pp. 181– 194.

Peng Y., Yang H., Wang N., Ouyang Y., Yi Y., Liao L., Shen H., Hu G., Wang Z. and Tao L. (2014) 'Fluorofenidone attenuates hepatic fibrosis by suppressing the proliferation and activation of hepatic stellate cells', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(3), pp. G253—G263.

Pichler C., Boettler T. and Thimme R. (2016) 'Cholestatische Lebererkrankungen', *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 141(23), pp. 1683–1687.

Poordad F. F. (2007) 'Review article: The burden of hepatic encephalopathy', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 25(SUPPL. 1), pp. 3–9.

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

Prowpanga, U., Donghee, K. and Ray, K. W. (2015) 'Current and Future Burden of Chronic Nonmalignant Liver Disease', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(12), pp. 2031–3041.

Raphael, K. C. and Shali Matuja, S. (2016) 'Hepatic Encephalopathy; Prevalence, Precipitating Factors and Challenges of Management in a Resource-Limited Setting', *Journal of Gastrointestinal & Digestive System*, 6(3), pp. 6–10.

Rikkers L., Jenko P., Rudman D. and Freides D. (1978) 'Subclinical Hepatic Encephalopathy: Detection, Prevalence, and Relationship To Nitrogen Metabolism', *Gastroenterological Association*, 75(3), pp. 75462–469.

Alazar-Montes A., Ruiz-Corro L., López-Reyes A., Castrejón-Gómez E. and Armendáriz-Borunda J. (2008) 'Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis', *European Journal of Pharmacology*, 595(1-3), pp. 69-77.

Sanabria A. J., Dion R., Lúcar E. and Soto J. C. (2013) 'Evolution of the determinants of chronic liver disease in Quebec', *Chronic diseases and injuries in Canada*, 33, pp. 137-145.

Sharma B. and Sharma P. (2010) 'Predictors of minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis', *Saudi Journal of Gastroenterology*, 16(3), pp. 181.

Pearson S. D., Banken R., Chapman R., Russo E. T., Loos A. M., Emond S. K., Ollendorf D. A., Chhatwal J., Hur C., Klebanoff M. and Samur S. (2016) 'Obeticholic Acid for the Treatment of Primary Biliary Cholangitis: Comparative Clinical Effectiveness, Value, and Value-Based Price Benchmarks', *Institute for Clinical Economic Review*.

Verbeke L., Farre R., Verbinnen B., Covens K., Vanuytsel T., Verhaegen J., Komuta M., Roskams T., Chatterjee S., Annaert P., Vander Elst I., Windmolders P., Trebicka J., Nevens F. and Laleman W. (2014) 'The FXR agonist obeticholic acid prevents gut barrier dysfunction and bacterial translocation in cholestatic rats', *American Journal of Pathology. American Society for Investigative Pathology*, 185(2), pp. 409–419.

Vilstrup H., Amodio P., Bajaj J., Cordoba J., Ferenci P., Mullen K.D., Weissenborn K. and Wong P. (2014) 'Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: 2014 Practice Guideline by AASLD and EASL', The American Association for the Study of Liver Diseases, Practice Guideline.

Vojvodic M., Young A., Tyrell A., and Wang V. (2014) 'Clinical handbook : Toronto notes 2014', Toronto, Ontario : Toronto Notes for Medical Students Inc.

Walf A. A. and Frye C. A. (2013) 'The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents', *Nature protocols*, 2(2), pp. 322–328.

Weber, F.L. (1996) 'Lactulose and combination therapy of hepatic encephalopathy: The role of the intestinal microflora', *Digestive Diseases* 14, pp. 53–63.

Wu K. C., Huang H. C., Chang T., Lee W. S., Chuang C. L., Hsin I. F., Hsu S. J., Lee F. Y., Chang C. C. and Lee S. D. (2018) 'Effect of sirolimus on liver cirrhosis and hepatic encephalopathy of common bile duct-ligated rats', *European Journal of Pharmacology*, 824, pp. 133-139.

Yang X. (2009) 'Le role du stress oxydatif/nitrosatif dans la pathogénèse de l'encéphalopathie hépatique chronique' mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal en vue de l'obtention du grade de maîtrise en science biomédicales.

Yang N., Liu H., Jiang Y., Zheng J., Li D. M., Ji C., Liu Y. Y. and Zuo P. P. (2015) 'Lactulose enhances neuroplasticity to improve cognitive function in early hepatic encephalopathy', *Neural Regeneration Research*, 10(9), pp. 1457–1462.

Yoon Y. J., Friedman S. L. and Lee Y. A. (2016) 'Antifibrotic Therapies: Where Are We Now?', *Seminars in Liver Disease*, 36(1), pp. 83–98.

Zivkovic S.A. (2013) 'Neurologic complications after liver transplantation', *World J. Hepatol.* 5, 409–416.