

Université de Montréal

**Interventions thérapeutiques prometteuses dans un modèle *in vivo* de
stéatohépatite non alcoolique**

par

Yara Haddad

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

en Pharmacologie

Avril 2008

© Yara Haddad, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Interventions thérapeutiques prometteuses dans un modèle *in vivo* de
stéatohépatite non alcoolique**

Présenté par

Yara Haddad

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Denis de Blois, président-rapporteur

Dr. Michel Charbonneau, membre du jury

Dr. Pierre S. Haddad, directeur de recherche

RÉSUMÉ

La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie du foie dont l'amplitude et les répercussions sont de plus en plus préoccupantes dans le monde médical ou biomédical. Elle est associée à l'obésité, au syndrome métabolique et au diabète sucré de type II. La recherche de la thérapie optimale pour le NASH est un domaine en plein essor puisqu'aucun traitement n'est suffisamment efficace à ce jour.

La présente étude fait le point sur de nouvelles possibilités de traitements qui se sont avérés efficaces pour contrer les différentes lésions métaboliques et cellulaires rencontrées dans un modèle *in vivo* chez le rat où le NASH est induit par l'ingestion d'une diète riche en gras. Cette étude démontre, tout d'abord, que les traitements durant six semaines avec l'acide ursodéoxycholique (UDCA) et son dérivé le NCX 1000, possédant des propriétés donatrices de monoxyde d'azote, à doses équimolaires, protègent de manière équivalente le foie contre le stress oxydatif, l'hyperinsulinémie, l'inflammation et la fibrose causés par la stéatohépatite. De plus, la combinaison d'une plus faible dose de NCX 1000 avec un antioxydant lipophile tel que la vitamine E offre une protection similaire, particulièrement au niveau des paramètres du stress oxydatif. Par ailleurs, l'étude illustre aussi que la silibinine, composé polyphénolique actif du chardon marie (*Silybum marianum*) et utilisé en traitement pendant 5 semaines, possède un pouvoir hépatoprotecteur, des propriétés antioxydantes et un effet hypoinsulinémique dans ce modèle de stéatohépatite d'origine nutritionnelle.

Le potentiel thérapeutique de ces composés en fait des candidats de choix pour le traitement du NASH qui méritent de faire l'objet d'études cliniques poussées.

Mots clés : NASH, stéatose, stress oxydatif, diète riche en graisses, résistance à l'insuline, NCX 1000, UDCA, vitamine E, silibinine, chardon-Marie.

ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a serious liver condition related to the metabolic syndrome, obesity, and type II diabetes mellitus whose prevalence is drastically rising in developed countries and worldwide. Several remedies were investigated for the treatment of NASH but an efficient therapy has yet to be developed.

In the present study, we explored novel therapeutic possibilities that were thought to be effective for the treatment of experimental high-fat diet-induced NASH in the rat. Our results show that a chronic six week treatment with a high dose of NCX 1000, a derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA) with nitric oxide (NO) donating properties, is efficient at reversing steatosis, oxidative stress, inflammation, insulin resistance and fibrosis; major hallmarks of experimental NASH. We also demonstrated that the mother molecule, UDCA, is as efficacious in controlling the same parameters at equimolar doses. Moreover, our study demonstrates that NCX 1000 at lower doses can exert similar potent properties when combined with lipophilic antioxidants like vitamin E. On the other hand, we found that a 5-week treatment with silibinin, the major active component of milk thistle extract, improved liver steatosis and inflammation and decreased NASH-induced oxidative stress, insulin resistance, and fibrosis.

These compounds have therefore the potential for being developed for the treatment of NASH. Clinical evidences are needed.

Keywords: NASH, oxidative stress, steatosis, high-fat diet, insulin resistance, NCX 1000, UDCA, vitamin E, silibinin, milk thistle.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiii

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 DESCRIPTION DE LA PATHOLOGIE	1
1.2 DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC DE LA MALADIE	5
1.3 PATHOGÉNÈSE DU NASH	6
1.3.1 THÉORIE DES DEUX ATTAQUES	6
1.3.1.1 LA PREMIÈRE ATTAQUE : <i>LA STÉATOSE HÉPATIQUE</i>	7
1.3.1.1.1 L'IMPORTANCE DE LA RÉSISTANCE À L'INSULINE : RELATION AVEC LA STÉATOSE HÉPATIQUE	9
1.3.1.2 LA SECONDE ATTAQUE : <i>LE STRESS OXYDATIF</i>	12
1.3.2 RÔLE DE LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU NASH	15
1.3.3 LA FIBROSE HÉPATIQUE	16
1.3.4 LA CIRRHOSE HÉPATIQUE	17
1.4 LES MODÈLES ANIMAUX DE LA STÉATOHÉPATITE NON ALCOOLIQUE	18
1.4.1 MODÈLE DE TOXICITÉ DE L'AMIODARONE : NASH D'ORIGINE MÉDICAMENTEUSE	18
1.4.2 MODÈLE DES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT OBÈSES (Ob/Ob)	19
1.4.3 MODÈLE DE LA DIÈTE DÉFICIENTE EN CHOLINE ET EN MÉTHIONINE	20
1.4.4 MODÈLE DE LA DIÈTE RICHE EN GRAS	21
1.5 APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENTS DU NASH	24
1.5.1 TRAITEMENTS NON PHARMACOLOGIQUES	24
1.5.1.1 LA PERTE DE POIDS ET L'EXERCICE PHYSIQUE	24
1.5.2 TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES	25
1.5.2.1 LES AGENTS ANTIOXYDANTS	25

1.5.2.2 LES AGENTS HYPOLIPIDÉMIANTS	28
1.5.2.3 LES AGENTS ANTIDIABÉTIQUES ET INSULINO-SENSIBILISATEURS	29
1.5.2.4 LES AGENTS CYTOPROTECTEURS	31
1.6 MISE AU POINT DU MODÈLE	33
1.7 BUT DE L'ÉTUDE	36
CHAPITRE II: LE PREMIER MANUSCRIT	38
ABSTRACT	39
INTRODUCTION	40
MATERIALS AND METHODS	42
RESULTS	47
DISCUSSION	51
ACKNOWLEDGMENTS	56
REFERENCES	57
TABLES	62
FIGURE LEGENDS	65
FIGURES	67
CHAPITRE III: LE SECOND MANUSCRIT	73
ABSTRACT	75
INTRODUCTION	76
MATERIALS AND METHODS	78
RESULTS	83
DISCUSSION	87
REFERENCES	91
TABLES	97
FIGURE LEGENDS	100
FIGURES	102
CHAPITRE IV : DISCUSSION	108
4.1 MISE AU POINT DU MODÈLE	109

4.2 LE TRAITEMENT AVEC LE NCX 1000	116
4.3 LE TRAITEMENT AVEC L'UDCA	119
4.4 LE TRAITEMENT AVEC UNE COMBINAISON DE NCX 1000 ET DE VITAMINE E	122
4.5 LE TRAITEMENT AVEC LA SILIBININE	124
CHAPITRE V : CONCLUSION	127
PERSPECTIVES FUTURES	128
BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II

Table I: Effect of treatments on body and liver weight	62
Table II: Effect of treatments on biochemical and lipid parameters	63
Table III: Liver histology scoring for macrovesicular steatosis and inflammatory cells infiltration	64

CHAPITRE III

Table IV: Effect of silibinin on body and liver weight	98
Table V: Effect of silibinin on biochemical and lipid parameters	99
Table VI: Effect of silibinin on liver histology scoring for macrovesicular steatosis and inflammatory cells infiltration	100

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1: Progression et histopathogénèse du NASH	4
Figure 2: Mécanismes physiopathologiques sous-jacents au NASH	8
Figure 3: Dysfonction mitochondriale dans le NASH	16
Figure 4: Le Silybum marianum	27
Figure 5: Effets de l'ingestion de la diète grasse pendant 6 semaines sur les paramètres histologiques	34
Figure 6: Effet de l'ingestion de la diète grasse pendant 6 semaines sur certains paramètres tirés de la mise au point du modèle NASH chez le rat	35

CHAPITRE II

Figure 7: Effect of treatments on glyceimic homeostasis	67
Figure 8: Effect of treatments on liver histology	68
Figure 9: Effect of treatments on inflammatory cytokines and adipokines	69
Figure 10: Effect of treatments on oxidative stress	70
Figure 11: Effect of treatments on mitochondrial ATP	71
Figure 12: Effect of treatments on CYP2E1 and PPAR- α	72

CHAPITRE III

Figure 13: Effect of silibinin on glyceimic homeostasis	103
Figure 14: Effect of silibinin on liver histology	104

Figure 15: Effect of silibinin on inflammatory cytokines and adipokines	105
Figure 16: Effect of silibinin on oxidative stress parameters	106
Figure 17: Effect of silibinin on mitochondrial ATP	107
Figure 18: Effect of silibinin on CYP2E1 and PPAR- α	108

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE	<i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonéanal
AGL	Acides gras libres
ALT	Alanine aminotransférase
AMPK	Protéine kinase dépendante de l'AMP-cyclique
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HOMA-IR	Indice de l'insulino-résistance
IR	Insulino-résistance
IRS-1	Substrat du récepteur à l'insuline 1
IRS-2	Substrat du récepteur à l'insuline 2
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéine de faible densité
MDA	Malondialdéhyde
N15	NCX 1000 (15 mg/kg)
N30	NCX 1000 (30 mg/kg)
N60	NCX 1000 (60 mg/kg)
NAFLD	Maladies de stéatose non alcoolique
NASH	Stéatohépatite non alcoolique

NO	Monoxyde d'azote
PKC	Protéine kinase C
PPAR- α	Récepteur activé de la prolifération des peroxyosomes α
PPAR γ	Récepteur activé de la prolifération des peroxyosomes γ
PUFAs	Acides gras polyinsaturés
SAMe	S-adénosylméthionine
TG	Triglycérides
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TZDs	Thiazolidinediones
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral α
UDCA	Acide ursodéoxycholique
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Haddad pour ses précieux conseils, son support académique et surtout pour la confiance qu'il a placée en moi, qui m'a permis de suivre mes ambitions et de m'exprimer pleinement dans ce projet.

Je tiens aussi à remercier Axcan Pharma pour leur soutien financier, leur gestion efficace et l'importance qu'ils ont accordée à cette recherche.

J'aimerais également témoigner une grande et sincère reconnaissance à l'égard de Diane Vallerand et d'Antoine Brault pour leur grande contribution à ce projet, leur expertise technique, leur soutien moral sans égal ainsi que pour la complicité extraordinaire et les merveilleux moments partagés durant deux ans.

Je remercie enfin mes amis et collègues de travail qui ont certainement contribué au succès de mon projet en installant un climat de travail plaisant, rendant ainsi mon passage au laboratoire des plus agréables.

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 DESCRIPTION DE LA PATHOLOGIE

La sédentarité et une alimentation riche en sucres et en calories sont de mauvaises habitudes de vie sous-jacentes à l'apparition de phénomènes épidémiques indésirables tels que les maladies métaboliques. Parmi ces dernières, l'obésité, le diabète de type II et le syndrome métabolique se retrouvent au premier rang et sont fortement liés par certains éléments qui les composent. Bien qu'il n'ait été officiellement décrit qu'en 1988, le syndrome métabolique affecte plus de 25 % de la population occidentale de nos jours et son incidence ne cesse d'augmenter. Il est caractérisé par la présence de 3 des caractéristiques suivantes : une perturbation de la tolérance au glucose, une dyslipidémie, l'hypertension, et surtout l'obésité abdominale et l'insulino-résistance (IR). Plusieurs études ont démontré que ces éléments sont très intimement associés au développement des maladies reliées à la stéatose hépatique d'origine non alcoolique, connues sous le terme anglais « Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases » ou « NAFLD ». Conséquemment, la prévalence des NAFLD augmente inévitablement et de façon synchronisée avec celle du syndrome métabolique. En effet, les NAFLD sont à présent considérés comme l'expression hépatique du syndrome métabolique et représentent la cause la plus commune de désordres hépatiques touchant plus du tiers de la population générale [1].

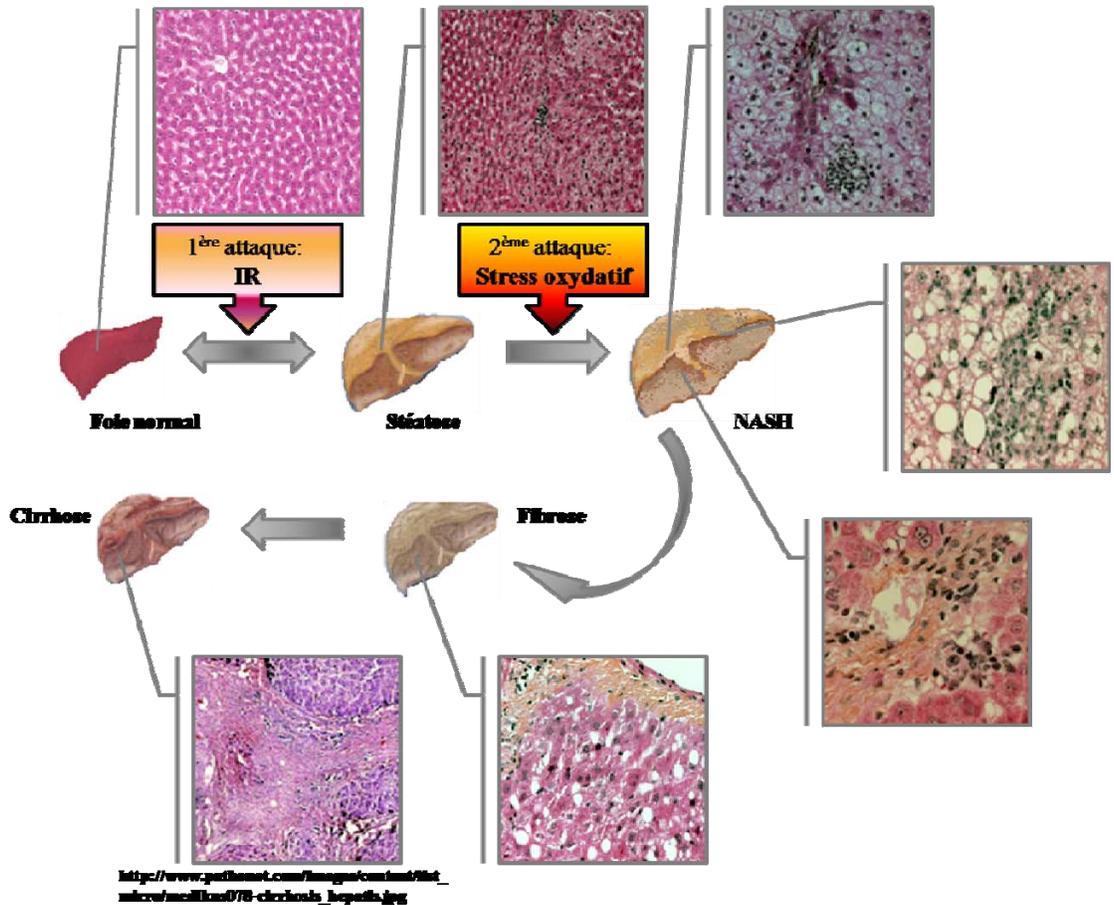
Les répercussions des NAFLD couvrent une gamme de désordres en commençant par la stéatose simple qui se reflète par une accumulation de vésicules graisseuses dans les hépatocytes. Ensuite, cet état peut être accompagné par une inflammation légère ou atteindre la stéatohépatite en dernier lieu. Les premières situations sont bénignes et facilement réversibles par l'exercice et un régime alimentaire équilibré. Par contre, la stéatohépatite est une affection sérieuse et progressive pouvant évoluer vers la fibrose ou même, dans certains cas, vers la

cirrhose (*Figure 1*). Cette pathologie comprend une invasion sévère du cytoplasme des hépatocytes, souvent ballonnés, par des macrovésicules de graisses accompagnée d'une importante infiltration de cellules immunitaires (notamment des neutrophiles polymorphonucléaires), de lésions nécrotiques, de corps de Mallory et de dépôts de collagène (*Figure 1*). Cette hépatite du foie gras s'apparente en tous points à la stéatohépatite alcoolique mais la distinction de son étiologie lui confère le nom de stéatohépatite non alcoolique, traduite du terme anglais « Nonalcoholic Steatohepatitis » d'où l'acronyme « NASH ».

Il y a près de 50 ans, un lien a été établi pour la toute première fois entre l'obésité et les maladies de la stéatose hépatique par Westwater et Fainer [2]. Ce moment reflète le début de l'ascension de l'incidence de l'obésité principalement due à un régime alimentaire riche en gras et en calories et marqué par un manque flagrant d'exercice physique. Ce phénomène grandissant affecte surtout les pays industrialisés où l'inactivité physique et les régimes riches en lipides sont prépondérants. En fait, les NAFLD atteignent 76 % des personnes obèses et 100 % des personnes sévèrement obèses dans ces pays [3]. Ce n'est qu'en 1979, près de deux décennies plus tard, qu'Adler et Schaffner ont décrit les caractéristiques de la stéatohépatite et de la cirrhose comme étant similaires à celles présentes dans les maladies alcooliques du foie [4]. Peu de temps ensuite, en 1980, J. Ludwig et son équipe de pathologistes de la Clinique Mayo de Rochester ont employés pour la première fois le terme NASH pour référer à cette même série de lésions hépatiques observée chez un groupe de patientes obèses et souvent diabétiques, ne consommant que peu ou pas d'alcool [5]. Puisque le NASH est une affection asymptomatique, son incidence a longtemps été sous-estimée. Ce n'est que vers la fin des années 90 qu'il y ait eu prise de conscience de l'ampleur de la menace qu'il représente. On a alors assisté à une explosion du nombre de publications scientifiques sur le NASH, sa pathogénèse et les moyens préventifs à son développement. Aujourd'hui, il est considéré comme l'une des hépatopathies sérieuses les plus fréquentes dans les pays occidentaux avec une prévalence générale de 3 %, affectant également les deux sexes, sans toutefois être exclusive aux patients obèses ou diabétiques [1, 6].

Le NASH se divise en deux sous catégories selon l'origine causale des lésions hépatiques. Lorsqu'il est causé par un désordre métabolique, il est considéré de type primaire. Par ailleurs, lorsque les lésions sont dues soit à la prise de médicaments tels que l'amiodarone, le tamoxifène, certains antirétroviraux incluant le stavudine et le zidovudine, les œstrogènes synthétiques ou les corticostéroïdes, soit à une intervention chirurgicale impliquant une gastroplastie ou un pontage intestinal, soit à une maladie génétique telle que la maladie de Wilson, le NASH est alors dit de type secondaire.

Figure 1 : Progression et histopathogénèse du NASH. Les différentes étapes des maladies hépatiques non alcooliques, représentées par des coupes histologiques provenant en partie de l'étude présentée dans ce mémoire. La théorie des deux attaques de la pathogénèse du NASH est aussi représentée à travers l'insulino-résistance qui induit la stéatose hépatique, qui à son tour sensibilise le foie aux attaques subséquentes par le stress oxydatif, laissant place au NASH (coloration HPS, agrandissements 10x, 20x, 40x et 63x).



1.2 DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC DE LA MALADIE

Globalement, la stéatohépatite non alcoolique est une pathologie asymptomatique et ses rares symptômes ne sont observables qu'aux stades avancés de la maladie, lorsque la fibrose est indéniablement installée. Ils se reflètent par des épisodes répétés de fatigue et parfois par un inconfort dans la partie supérieure droite de l'abdomen. À l'examen physiologique, on note le plus souvent un surplus du poids tronculaire accompagné d'une hépatomégalie. Un changement du niveau des enzymes hépatiques, soient l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) est indicatif d'un certain dysfonctionnement hépatique. Lors d'un examen de routine, l'obésité et la perturbation des transaminases hépatiques, plus précisément un ratio AST/ALT plus petit que 1 [7], constituent des indices communs aux patients atteints du NASH. Cependant un diagnostic fiable ne peut être posé sans une biopsie hépatique. Bien que cette méthode soit invasive et refusée par certains patients, la biopsie du foie représente le test de référence par excellence pour distinguer le NASH d'une gamme bénigne et non progressive de NAFLD qui peut lui être similaire autant cliniquement que radiologiquement. En effet, la stéatose simple est une condition relativement stable mais la progression du NASH suit un cheminement redoutable quoique prédictible. D'un point de vue épidémiologique, parmi les patients atteints du NASH, 32 à 37 % progressent vers une fibrose alors que 5 à 20 % développent une cirrhose au cours d'une période de 10 ans selon une estimation de trois études indépendantes [8-10]. De plus, 12 % des patients atteints de stéatohépatite non alcoolique ont un pronostic défavorable et décèdent à l'intérieur d'une période de 10 ans d'une maladie hépatique [8]. Enfin, la stéatohépatite est un état inflammatoire prédisposant le patient à d'autres problèmes tels que les maladies cardiovasculaires.

1.3 PATHOGÉNÈSE DU NASH

En 1998, Day et collaborateurs ont proposé un modèle explicatif de la pathogénèse du NASH qu'ils ont nommé « The two-hit theory » ou l'hypothèse des deux attaques [11]. Bien que d'énormes progrès dans ce domaine aient vu le jour dans la dernière décennie, cette théorie reste jusqu'à présent la plus plausible et la plus cumulative des multiples éléments observés dans cette pathologie. Malgré tout, les détails précis des mécanismes sous-jacents au développement d'une stéatohépatite à partir d'une stéatose simple ne sont pas encore complètement élucidés. On considère cependant que ces mécanismes participent à un processus complexe impliquant plusieurs facteurs de risque et une multitude de désordres métaboliques, probablement favorisés par une certaine prédisposition génétique.

1.3.1 THÉORIE DES DEUX ATTAQUES

Le principe de ce modèle est fondé sur deux attaques consécutives basculant la fonction normale du foie et le propulsant à travers divers stages qui s'influencent mutuellement pour laisser place à un état final de stéatohépatite. En fait, il est suggéré par cette théorie que la stéatose isolée, constituant la première attaque, soit insuffisante pour façonner les lésions connues de la stéatohépatite. Par contre, cette accumulation de graisses rendrait le foie vulnérable à la seconde attaque, issue d'un stress oxydatif, qui déclencherait les processus inflammatoire et fibrotique. De plus, ces événements seraient promus par une résistance à l'insuline et impliqueraient la production de cytokines inflammatoires et la génération des lésions nécroinflammatoires caractéristiques au NASH (*Figure 1*).

1.3.1.1 LA PREMIÈRE ATTAQUE : LA STÉATOSE HÉPATIQUE

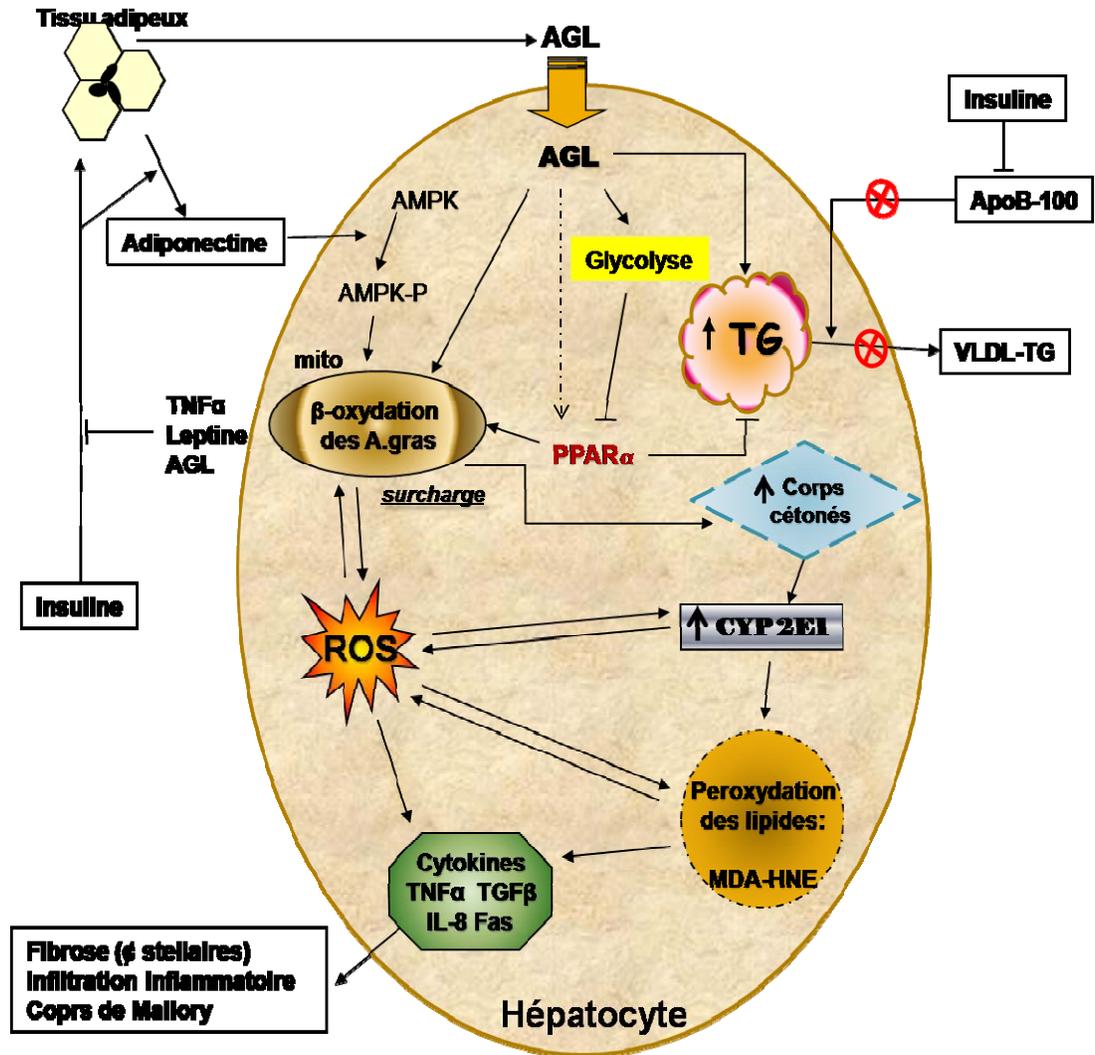
La première attaque proposée par cette hypothèse repose sur la stéatose du foie. Cette stéatose survient lorsque l'accumulation de corps gras, essentiellement des triglycérides, dans les hépatocytes excède 5 % du poids total du foie. Généralement, les cellules hépatiques ne contiennent que d'infimes traces de gras non-observables par microscopie optique. Cependant, elles sont programmées pour répondre à un stress métabolique en captant les acides gras libres, en les transformant en triglycérides et en les stockant dans des vacuoles à l'intérieur de leur cytoplasme (*Figure 1*).

La stéatose implique un déséquilibre entre la synthèse de triglycérides par les hépatocytes et leur évacuation dans le sang. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à ce désordre métabolique soient l'augmentation de la libération des acides gras libres (AGL) par le tissu adipeux, la hausse de la production de novo des AGL par le foie lui-même à partir des glucides et des acides aminés, la perturbation de la β -oxydation mitochondriale des acides gras libres servant à produire de l'adénosine triphosphate (ATP) et la diminution de l'évacuation hépatique des triglycérides vers la circulation sanguine (*Figure 2*). La sécrétion des lipides par le foie se fait majoritairement sous forme de lipoprotéines de très faible densité (« very low density lipoprotein » ou VLDL) qui est une association de triglycérides et de protéines transporteuses [12]. Toutes les dysfonctions décrites ci-dessus sont promues par la résistance à l'insuline rencontrée chez la plupart des patients souffrant de stéatose hépatique [13]. En fait, il est connu que, même en l'absence d'intolérance au glucose, l'insulino-résistance joue un rôle crucial dans le développement de la stéatose et qu'elle constitue un puissant prédictateur des NAFLD [14, 15].

La stéatose hépatique peut être due à des troubles d'origine nutritionnelle, métabolique et endocrinienne ou par certains composés chimiques. Les causes nutritionnelles incluent l'obésité, la sous-alimentation, la carence protéidique et le pontage intestinal chez certains patients souffrant d'hyperlipidémie. Les causes métaboliques et endocriennes comprennent le diabète juvénile de type I, le diabète non insulino-dépendant de type II ainsi que les perturbations hormonales telles que

l'hyperinsulinémie et l'hyperadiponectinémie qui contribuent à l'insulino-résistance. Finalement, les composés chimiques causant la stéatose du foie englobent l'alcool, la tétracycline, la cortisone, l'amiodarone et plusieurs autres médicaments qui altèrent la fonction mitochondriale.

Figure 2 : Mécanismes physiopathologiques sous-jacents au NASH.



Légende : AGL, acides gras libres; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TG, triglycérides; mito, mitochondrie; MDA, malondialdéhyde; 4-HNE, *trans*-4-hydroxy-2-nonénal; ♢, cellules; →, induit et —|, inhibe. Les diverses voies sont expliquées en détails dans le texte.

1.3.1.1.1 L'importance de la résistance à l'insuline : relation avec la stéatose hépatique

Les études métaboliques chez les humains et les animaux révèlent unanimement une relation entre l'obésité viscérale, la stéatose et l'IR. De plus, tous ces éléments sont communs à la majorité des patients atteints du NASH. Ainsi, le rôle de l'IR prend une place primordiale dans la pathogénèse de cette maladie, notamment dans l'initiation de la première attaque (*Figure 1*).

Normalement, après l'ingestion d'un repas, l'insuline inhibe la lipolyse des tissus adipeux et diminue la β -oxydation mitochondriale hépatique des AGL afin d'en synthétiser des triglycérides. Ces derniers sont emmagasinés dans le cytoplasme et exportés vers les tissus périphériques sous forme de VLDL. Cette opération requiert la participation de protéines transporteuses et de lipoprotéines telles que les apolipoprotéines apo B-100 et apoE. Lors d'une résistance à l'insuline, la lipolyse n'est plus aussi efficacement bloquée par l'insuline ce qui provoque une libération accrue des AGL à partir des graisses viscérales et leur acheminement vers le foie via la circulation porte. Le foie capte alors plus d'AGL afin de maintenir l'équilibre intracellulaire tout en augmentant la β -oxydation mitochondriale de ces corps gras ainsi que leur exportation vers la circulation sanguine sous la forme de VLDL. Par ailleurs, l'hyperinsulinémie tend à rétablir l'inhibition β -oxydation mitochondriale des AGL et de la formation de l'apo B-100 (*Figure 2*). Néanmoins, le résultat net se traduit par une stéatose hépatique provoquée par l'accumulation des AGL et des triglycérides dans les hépatocytes [16, 17].

Pourtant, le débat sur l'attribution de la case départ de la pathogénèse du NASH à la stéatose hépatique ou à la résistance à l'insuline est encore ouvert. La théorie prédominante prône l'apparition de la stéatose avant celle de la résistance à l'insuline en se basant sur plusieurs études qui ont démontré qu'une alimentation riche en gras induit à court terme une stéatose alors que l'IR s'installe à long terme [18-20]. Parallèlement, certains chercheurs affirment qu'en traitant la stéatose il est possible de corriger la résistance à l'insuline. Par opposition, l'insuline est connue pour inhiber

l'oxydation mitochondriale des acides gras et la résistance à l'insuline pourrait donc survenir avant la stéatose. Ainsi, une dysfonction mitochondriale pourrait causer une augmentation de la concentration des acides gras dans les hépatocytes et de leur estérification en triglycérides ainsi qu'une diminution de leur excrétion, ce qui entrainerait le développement de stéatose [14, 21, 22]. Concrètement, les conséquences sont invariables et tous les auteurs s'entendent pour affirmer que la stéatose et l'insulino-résistance peuvent se causer et se promouvoir mutuellement.

L'insuline régule la recapture, l'oxydation et le stockage du glucose dans les tissus sensibles à l'insuline tels que le foie, les muscles squelettiques et les tissus adipeux. En fait, l'insuline module l'activité intracellulaire en activant au moins neuf voies de signalisation via des cascades moléculaires qui débutent avec l'autophosphorylation des résidus tyrosine des deux substrats du récepteur à l'insuline (« Insulin Receptor Substrate-1 and 2 » ou IRS-1 et IRS-2). La résistance à l'insuline est associée avec un surplus d'acides gras et de leurs métabolites (l'acyl-CoA, le diacylglycérol et les céramides) qui activent les isoformes theta (θ) et epsilon (ϵ) de la protéine kinase C (PKC) dans les hépatocytes et les myocytes, respectivement. Ces formes de PKC favorisent la phosphorylation des IRS-1 et IRS-2 aux résidus sérines/thréonines ce qui inhibe la voie physiologique de la phosphorylation des tyrosines causant ainsi une diminution de la réponse à l'insuline [16].

Ce mécanisme est aussi induit par les cytokines proinflammatoires, plus particulièrement par le facteur de nécrose tumoral α (« Tumor Necrosis Factor α » ou TNF- α), via l'activation des protéines JNK, PKC et I κ B, pour ainsi exercer un contrôle étroit sur la sensibilité à l'insuline. De plus, ce facteur déprime l'expression des protéines qui contrôlent la captation des acides gras libres et la lipogenèse, menant ainsi à une augmentation des niveaux d'AGL circulants. En plus de son rôle connu d'antagoniste aux effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine, le TNF- α favorise l'insulino-résistance en diminuant l'expression du récepteur activé de la prolifération des peroxyosomes γ (« peroxisome proliferator activated receptor gamma » ou PPAR γ), un récepteur nucléaire jouant un rôle capital dans le maintien d'une sensibilité normale

à l'insuline (*Figure 2*). Le TNF- α perturbe aussi la sécrétion des VLDL en réduisant la sécrétion de l'apoE et l'expression d'apo B-100 dans les cellules hépatiques [16].

Chez les patients souffrant du NASH, les niveaux de TNF- α plasmatiques corrént directement avec le degré d'obésité abdominale ainsi qu'avec le degré d'hyperinsulinémie. En effet, plusieurs études animales ont démontré l'absence du développement de l'IR chez des souris obèses dont le gène codant pour le TNF- α a été supprimé [23]. De plus, le niveau circulant du TNF- α et l'expression hépatique de son récepteur de type 1 sont élevés chez les patients souffrant de NASH [24, 25].

La sensibilité à l'insuline est aussi intimement associée aux adipokines sécrétées par le tissu adipeux, telles que l'adiponectine et la leptine [26, 27]. L'adiponectine agit sur le foie en stimulant la β -oxydation mitochondriale des AGL et l'utilisation du glucose via l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMP («AMP dependent protein kinase » ou AMPK) [28] (*Figure 2*). De plus, elle exerce un effet anti-inflammatoire et diminue la résistance à l'insuline en inhibant la synthèse et la libération du TNF- α par les macrophages [29, 30] et en induisant le récepteur activé de la prolifération des peroxysomes α (« peroxisome proliferator-activated receptor- α » ou PPAR- α). Ce dernier est un facteur de transcription qui joue un rôle primordial dans la détection d'excès d'AGL et dans l'induction des gènes responsables du métabolisme des lipides. L'activation pharmacologique du PPAR- α renverse complètement le NASH expérimental et son rôle dans la pathogénèse de cette maladie est de plus en plus étudié dans les modèles animaux [31]. Le niveau d'adiponectine diminue considérablement chez les patients atteints d'IR, de diabète de type II, d'obésité et de NAFLD [32]. Présentement, l'administration exogène d'adiponectine suscite l'intérêt de plusieurs puisqu'elle semble renverser plusieurs formes expérimentales de NAFLD et de NASH [33]. Finalement, une baisse du niveau d'adiponectine circulant est inversement associé au degré de nécro-inflammation et de fibrose chez les patients souffrant de NASH [25, 34, 35].

La leptine est une autre adipokine qui joue un rôle important dans la régulation de la répartition des lipides entre la β -oxydation mitochondriale et la synthèse des

triglycérides. Un défaut dans la synthèse ou la signalisation de la leptine, tel que démontré chez les souris Ob/Ob, est associé à une accumulation de lipides et une perturbation de la β -oxydation mitochondriale au niveau du foie [36]. Par contre, même si la leptine semble corriger le NASH chez les patients atteints d'une lipodystrophie sévère [37], plusieurs études ont démontré que le niveau de leptine dans le sérum est proportionnel au degré de sévérité de la stéatose dans les cas de NASH associés avec l'obésité, l'IR et le syndrome métabolique [38, 39]. Ceci indique que le foie pourrait développer un état de résistance à la leptine en devenant réfractaire aux effets antilipémiants de cette hormone [38].

1.3.1.2 LA SECONDE ATTAQUE : *LE STRESS OXYDATIF*

Bien que la progression du foie d'un état de stéatose simple avec résistance à l'insuline vers une stéatohépatite ne soit pas complètement clarifiée, la peroxydation des lipides et l'inflammation, alimentées par le stress oxydatif, semblent en être les principaux pions (*Figure 1*). Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre les espèces chimiques pro-oxydantes et antioxydantes qui se traduit en lésions nécro-inflammatoires. Les espèces pro-oxydantes, mieux connues sous le terme de radicaux libres de l'oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species » ou ROS), comprennent l'anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'oxydation des acides gras est une source importante de ces radicaux libres dans un foie stéatosé. En effet, une surcharge d'AGL dans le foie cause une augmentation de leur oxydation mitochondriale ainsi que de la production de ROS. Ces derniers peuvent causer une gamme de dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN cellulaire, en plus de recruter les cellules inflammatoires pour générer des lésions de stéatohépatite qui peuvent laisser place à la fibrose et parfois aboutir en cirrhose. Ainsi, la seconde attaque représente un agencement d'insultes survenant simultanément dans un foie rendu préalablement vulnérable par la stéatose et la résistance à l'insuline.

Sur une échelle moléculaire, le stress oxydatif est présent à plusieurs niveaux. Tout d'abord, tel que mentionné plus-haut, un foie gras représente un endroit idéal pour la génération de ROS. En effet, l'augmentation de l'influx d'AGL vers le foie cause une élévation de leur β -oxydation par les mitochondries (*Figure 2*). Or, une dysfonction mitochondriale peut résulter de cette surcharge en oxydation et ainsi induire une perturbation dans les chaînes respiratoires menant à une production anormalement élevée de ROS. Par conséquent, des voies alternatives à l'oxydation des AGL telles que la β -oxydation peroxysomale et l' ω -oxydation microsomale sont activées, ce qui résulte en un surplus de production de radicaux libres et de corps cétonés [40, 41] (*Figure 2*).

L'accumulation de corps cétonés induit l'expression du cytochrome P450 CYP2E1, enzyme responsable de leur métabolisme [11, 41, 42] et catalyseur majeur de la formation du stress oxydatif [43]. Effectivement, son rôle pathologique dans le NASH a été démontré dans plusieurs études tant sur des modèles animaux [44-46] que chez des patients [43, 47, 48]. De plus, l'expression accrue du CYP2E1 provoque une amplification de ROS intracellulaires même en l'absence de substrat [41, 49] (*Figure 2*).

Les radicaux libres engendrent des effets locaux puisqu'ils possèdent une durée de vie relativement courte. Ils s'attaquent donc aux molécules à proximité, dont les lipides accumulés à l'intérieur des hépatocytes, plus particulièrement aux acides gras polyinsaturés (« polyunsaturated fatty acids » ou PUFAs). Ils initient ainsi la peroxydation lipidique et forment, par cassures des hydroperoxydes lipidiques, des aldéhydes très réactifs. Ces derniers agissent ensuite comme des seconds messagers toxiques qui perpétuent les dommages initiés par les radicaux libres. Parmi ces aldéhydes, les mieux connus et étudiés sont le *trans*-4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) [40] (*Figure 2*). La liaison covalente de ces produits néfastes aux phospholipides de la membrane mitochondriale altère sa perméabilité, causant ainsi une dysfonction mitochondriale. De surcroît, la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire cause un ballonnement hépatocytaire et la nécrose [50]. Aussi, ces aldéhydes toxiques peuvent activer les cellules stellaires hépatiques [51] qui

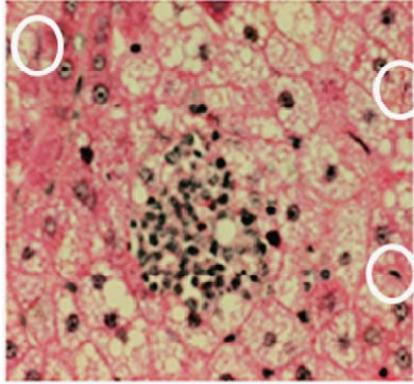
synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire et lient les protéines de cytot kératine pour former les corps de Mallory [40, 52]. Ils déclenchent aussi une réaction inflammatoire en recrutant diverses populations de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles polymorphonucléaires et les monocytes, par chimiotactisme [53]. Par ailleurs, les ROS contribuent davantage à la réaction immunitaire en stimulant la production de cytokines proinflammatoires telles que le facteur de croissance transformant beta (« transforming growth factor β » ou TGF- β), l'interleukine-8, le ligand Fas et le TNF- α [24] (*Figure 2*).

Afin de se protéger contre le stress oxydatif, toutes les cellules hépatiques possèdent des systèmes de défense intrinsèques. Ces systèmes comprennent des réactions enzymatiques antioxydantes catalysées par la superoxyde dismutase et la catalase, ainsi que des mécanismes non enzymatiques tels que l'oxydoréduction par le glutathion. Le Glutathion (GSH; dans son état réduit) est un tripeptide formé des acides aminés L-Cystéine, acide L-Glutamique et Glycine. Principalement produit par le foie, le GSH est l'antioxydant naturel le plus puissant du corps humain, utilisé comme première ligne de défense pour éliminer les substances toxiques, polluantes et carcinogènes. Il combat également les radicaux libres qui endommagent l'ADN, accélèrent le vieillissement, affectent les défenses immunitaires et sont la cause directe ou indirecte de troubles cellulaires, métaboliques et fonctionnels. Plusieurs études ont démontré que le NASH est associé à des niveaux très bas de GSH chez certains patients [54, 55], stipulant qu'une dysfonction dans le système de défense cellulaire pourrait contribuer aux lésions de stéatohépatite. Pourtant, la situation inverse semble être tout aussi vraisemblable, puisqu'un niveau élevé de GSH a été noté chez des patients atteints du NASH [56, 57] ainsi que dans les modèles expérimentaux de NASH chez les animaux [58, 59]. Ceci s'expliquerait par une production compensatoire accrue de GSH pour pallier à l'attaque massive des ROS, survenant lors de l'initiation et du développement de la stéatohépatite, juste avant l'apparition d'une déféctuosité quelconque dans ce système de défense, causant une pénurie d'antioxydants. En somme, la saturation ou la défaillance de la défense antioxydante hépatique peut grandement contribuer à la pathogénèse du NASH.

1.3.2 Rôle de la dysfonction mitochondriale dans la physiopathologie du NASH

Plusieurs chercheurs ont attribué un rôle primordial à la dysfonction mitochondriale dans la pathogénèse du NASH. En effet, diverses études ont rapporté des anomalies ultra-structurales des mitochondries hépatiques, incluant des inclusions para-cristallines et des méga-mitochondries [22, 40, 60], chez les patients souffrant du NASH (voir *Figure 3*). De plus, on observe dans les hépatocytes de ces patients une diminution de l'activité enzymatique des complexes protéiques des chaînes respiratoires mitochondriales [61] et de la synthèse d'ATP, ce qui suggérerait une perturbation de l'équilibre énergétique [62]. Les mécanismes contribuant possiblement à la dysfonction mitochondriale dans les conditions de stéatohépatite incluent le découplage de la respiration mitochondriale par les AGL, les produits de la peroxydation lipidique et le TNF- α . Cette cytokine participe également par d'autres moyens au cercle vicieux de la dysfonction mitochondriale, notamment en provoquant l'ouverture du pore de transition de la perméabilité membranaire, causant ainsi une déplétion du cytochrome *c* [63]. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que les dommages reliés à la chaîne respiratoire mitochondriale sont les causes majeures de la surproduction de radicaux libres dans le NASH [62, 64]. En effet, la moindre perturbation dans le flot des électrons de la chaîne respiratoire peut causer une augmentation de la réduction des composants protéiques en amont de la chaîne. Ces complexes réduits réagissent davantage avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde et d'autres ROS [65]. Or, la conséquence globale de ces lésions est une perturbation du transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire, ce qui induit une augmentation de la production de ROS mitochondriaux et de la peroxydation des lipides (*Figure 2*).

Figure 3 : Dysfonction mitochondriale dans le NASH. Évidence de la présence de méga-mitochondries (cercles blancs) dans une coupe histologique d'un foie de rat provenant du groupe NASH ayant reçu une diète riche en lipides durant douze semaines (coloration HPS, agrandissement 40x).



1.3.3 La fibrose hépatique

La fibrose hépatique résulte de l'activation des cellules de Kupffer et des cellules stellaires hépatiques. Suite à leur activation par l'ingestion de corps apoptotiques dont la présence est notée dans certains cas de NASH, les cellules de Kupffer produisent le TGF- β qui à son tour active les cellules stellaires hépatiques et les transforme en myofibroblastes producteurs de collagène [66, 67]. Le processus est déclenché par la régénération anarchique des hépatocytes non nécrotiques aboutissant à la constitution de nodules de régénération. Ceci induit une fibrose qui empêche la reconstitution de lobules normaux ayant perdu les connexions vasculaires et biliaires (*Figure 1*).

L'accumulation de collagène est souvent observée entre les hépatocytes et la couche endothéliale, dans les zones périvénulaires et périsinusoïdales. Plusieurs données suggèrent que le stress oxydatif et la peroxydation des lipides jouent un rôle important dans l'initiation et la progression de la fibrose [68] (*Figure 2*). En effet, les produits de la peroxydation des lipides pourraient participer à la fibrogénèse en stimulant la production de TGF- β par les cellules de Kupffer et en stimulant la

production excessive de collagène par les cellules stellaires activées [69]. Par ailleurs, une carence en antioxydants semble contribuer à la fibrose hépatique puisqu'une étude a révélé qu'une supplémentation en vitamine E inhibe la fibrogénèse hépatique chez des souris recevant une diète déficiente en méthionine et en choline pour induire le NASH [67]. De plus, un essai clinique chez des patients souffrant du NASH a démontré que la vitamine E réduit les niveaux plasmatiques de TGF- β ainsi que la fibrose hépatique [70]. Finalement, et bien que l'effet antilipémiant de la leptine aie été bien établi grâce aux modèles de rat Zucker et de souris Ob/Ob, Ikejima et collaborateurs ont démontré que la leptine produite par les cellules stellaires activées stimule la fibrose hépatique et pourrait contribuer à la progression du NASH vers la fibrose et la cirrhose chez le rat [71]. Le rôle de la leptine dans la fibrogénèse pourrait donc expliquer la relation entre le degré d'obésité et le risque de fibrose au cours du développement du NASH.

1.3.4 La cirrhose hépatique

La cirrhose hépatique est liée à l'installation préalable d'une fibrose dans le foie qui gêne son fonctionnement (*Figure 1*). Histologiquement, on retrouve une stéatose macrovésiculaire hépatique, des signes d'inflammation avec une infiltration de lymphocytes et de macrophages, la présence de corps de Mallory, une nécrose des cellules hépatiques, des méga-mitochondries et une hépatosidérose. Le stade de cirrhose est classiquement irréversible. Cet état peut ensuite évoluer en insuffisance hépatique et le taux de décès subséquent approche 85 % en 5 ans si le patient ne subit pas une transplantation du foie. Par ailleurs, l'hépatocarcinome est une complication classique et grave qui survient chez 2 à 7 % des patients cirrhotiques par an [72].

1.4 LES MODÈLES ANIMAUX DE STÉATOHÉPATITE NON ALCOOLIQUE

Les modèles animaux ont fournis de l'information précieuse sur tous les aspects de la physiopathologie du NASH. En tenant compte de la complexité des facteurs comportementaux, métaboliques et génétiques, ces modèles ont permis le tissage d'une base conceptuelle pour la recherche clinique sur cette maladie.

1.4.1 MODÈLE DE TOXICITÉ DE L'AMIODARONE : NASH D'ORIGINE MÉDICAMENTEUSE

Plusieurs médicaments, appartenant à la classe des amines cationiques amphiphiliques, sont utilisés en clinique pour le traitement de certaines maladies et sont fréquemment associés à des lésions de stéatohépatite. L'amiodarone, le perhexiline et le vasodilatateur coronarien 4,4'-diethyl-aminoethoxyhexestrol (DEAEH) figurent parmi ces médicaments qui, lorsqu'administrés de façon continue, peuvent initier le développement progressif de stéatohépatite chez l'humain [65, 73, 74].

Ces trois médicaments ont un mécanisme d'action très semblable. L'exemple le plus connu est le modèle de la toxicité de l'amiodarone chez la souris. L'amiodarone est un agent antiarythmique de classe III très efficace pour le traitement des tachycardies supraventriculaires et ventriculaires. Lorsqu'administré à des souris, il provoque l'inhibition de l'oxydation mitochondriale des AGL, conduisant à l'accumulation de lipides dans les hépatocytes ce qui produit une stéatose microvésiculaire du foie. De plus, l'amiodarone augmente la formation de ROS par les mitochondries en bloquant le transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, causant ainsi une augmentation de la peroxydation des lipides [75, 76]. Finalement, l'inhibition de la respiration mitochondriale réduit aussi les niveaux d'ATP cellulaires [77].

Suite à ces observations, le modèle animal de toxicité de l'amiodarone devient très instructif puisqu'il mime certains aspects de la pathologie du NASH du point de vue des caractéristiques histologiques et pathophysiologiques. Plusieurs avantages sont attribuables à ce modèle. Premièrement, le développement de la stéatose survient en moins de 24 heures suite à l'injection intra-péritonéale de la première dose d'amiodarone chez la souris. De plus, l'apparition des lésions de stéatohépatite et de fibrose sont observables en quelques jours seulement, contrairement aux autres modèles qui requièrent beaucoup plus de temps. Ensuite, ce modèle nécessite des souris normales, non-modifiées génétiquement, ce qui le rend très accessible et facilement reproductible. Par contre, la faiblesse de ce modèle réside dans l'absence de l'influence du syndrome métabolique qui, nous le savons à présent, est intimement associé au NASH.

1.4.2 MODÈLE DE SOURIS GÉNÉTIQUEMENT OBÈSES (OB/OB)

Les souris ayant une mutation non-sens du gène Ob, qui code pour la leptine, sont déficientes en leptine puisqu'elles sont incapables de la synthétiser. La leptine est une hormone produite par les tissus adipeux blancs pour le contrôle de la satiété au niveau des neurones hypothalamiques. Son rôle est d'inhiber la prise alimentaire et d'augmenter la dépense énergétique dans les tissus adipeux et le foie. Ainsi, les souris Ob/Ob, ayant une carence en leptine, deviennent hyperphagiques, inactives, et par conséquent, obèses [76]. De plus, ces souris sont résistantes à l'insuline, hyperinsulinémiques, hyperglycémiques et hyperlipidémiques. En somme, ces animaux développent spontanément la stéatose hépatique qui se transforme en stéatohépatite avec l'âge.

Ce modèle animal est celui qui a contribué le plus à la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement du NASH dans la dernière décennie. En effet, c'est en se basant sur ce modèle que Day et ses collaborateurs ont proposé l'hypothèse des deux attaques en 1998. Ils ont démontré que les attaques suivant la stéatose amplifient la génération de stress oxydatif dans le foie, ce qui stimule la

production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α [11] et la diminution de l'adiponectinémie. Conséquemment, les hépatocytes génèrent des radicaux libres en excès, deviennent résistants à l'insuline et s'engorgent de lipides. Ainsi, les traitements qui inhibent l'activité du TNF- α ou qui augmentent le niveau d'adiponectine améliorent les lésions de stéatohépatite chez les souris Ob/Ob.

En somme, ce modèle reproduit bien la condition humaine reliée au syndrome métabolique avec une seule exception; l'absence de la leptine. La leptine possède un large champ d'action, incluant des interactions avec les cellules stellaires, les macrophages, les lymphocytes et l'endothélium vasculaire. Or, l'absence de la leptine lors du développement de la stéatohépatite dans le modèle Ob/Ob soulève quelques doutes quant à la fiabilité du modèle. Pour pallier à cette faiblesse, un modèle de souris déficientes spécifiquement et uniquement en récepteurs neuronaux de la leptine a été développé et semble reproduire un phénotype similaire de stéatose [78]. Mais l'apparition subséquente des lésions de stéatohépatite demeure incertaine dans ce modèle. Par contre, comme tout autre modèle de déficience génétique, ces deux modèles ne sont principalement réalisables que chez la souris.

1.4.3 MODÈLE DE LA DIÈTE DÉFICIENTE EN CHOLINE ET EN MÉTHIONINE

L'administration d'une diète déficiente en choline et en méthionine à des souris et à des rats est un autre modèle utilisé fréquemment pour l'induction du NASH expérimental. La choline et la méthionine sont des donneurs de méthyle qui sont requis pour la synthèse des phosphatidylcholines, principaux composants des VLDL hépatiques. De plus, la méthionine est nécessaire pour la synthèse des précurseurs du glutathion. Une diète déficiente en choline et en méthionine cause donc l'épuisement des réserves hépatiques d'antioxydants, dont le glutathion réduit et la S- adénosylméthionine (SAME) chez les souris ou les rats [79]. Cette diète induit aussi la synthèse de TNF- α ainsi que d'autres cytokines proinflammatoires. Le stress oxydatif accru et le TNF- α activent la voie de la I κ K β , menant à l'insulino-résistance, aux

surcharges hépatiques en graisses et éventuellement à des lésions de stéatohépatite. Ce modèle animal s'est avéré très utile pour démontrer l'importance du stress oxydatif et des interventions nutritionnelles dans la pathogenèse de ces lésions. Cependant, il n'est pas représentatif de la réalité humaine puisqu'une déficience alimentaire en méthionine et en choline est très rarement rencontrée chez l'humain.

1.4.4 MODÈLE DE LA DIÈTE RICHE EN GRAS

La reconnaissance de l'importance du rôle de l'obésité et du syndrome métabolique dans la pathogénèse du NASH a attiré l'attention sur la nutrition comme point de départ pour l'induction de cette maladie dans un modèle expérimental. En effet, le modèle de NASH le plus courant et le plus similaire à la condition humaine est basé sur l'administration d'une diète excessivement riche en lipides (entre 50% et 100% de l'énergie totale dérivée des lipides) à des animaux murins. Diverses versions de cette diète ont été développées pour des fins de recherche et l'efficacité de plusieurs d'entre elles pour l'induction des éléments marqueurs du NASH a été démontrée. Parmi les nombreuses formules de cette diète, on retrouve notamment l'émulsion de lipides polyinsaturés administrée par gavage aux animaux [80], l'infusion intragastrique de lipides purs (100%) requérant une intervention chirurgicale [81-83] et la diète riche en lipides saturés administrée *ad libitum* aux animaux [31, 58, 84-87]. Ce modèle d'induction du NASH reflète incontestablement la réalité humaine dans les pays industrialisés, où prévalent l'inactivité physique, la mauvaise alimentation et l'obésité qui sous-tendent le développement des NAFLD.

La plupart des études utilisant le modèle de NASH induit par la diète grasse rapportent des mécanismes extrêmement semblables à la maladie humaine en plus d'être fidèles à la multitude de facteurs qui modulent les différents aspects de la maladie. Effectivement, l'ingestion abusive de lipides conduit à l'engorgement des hépatocytes par des vésicules graisseuses et place le foie en état de stéatose. De plus, une hyperinsulinémie et une insulino-résistance s'installent dans la plupart des cas et contribuent à la stéatose. Ensuite la peroxydation des lipides et le stress oxydatif

provoquent des dommages cellulaires importants à divers niveaux, recrutant ainsi les cellules immunitaires et les cytokines inflammatoires. De plus, la dysfonction mitochondriale est souvent citée comme élément central à la stimulation du stress oxydatif. D'autre part, lorsqu'une dysfonction mitochondriale survient, des voies alternatives à l'oxydation des AGL telles que la β -oxydation peroxysomale et l' ω -oxydation microsomale sont activées, ce qui résulte en surplus de production de radicaux libres et de corps cétonés [40]. L'accumulation de corps cétonés induit l'expression du CYP2E1, enzyme responsable de leur métabolisme [41]. Enfin, dans certains cas, une production croissante de collagène par les cellules stellaires activées par les cytokines inflammatoires favorise l'atteinte d'une fibrose hépatique progressive. Tous ces éléments sont véritablement représentatifs des traits physiopathologiques rencontrés dans la condition humaine et démontrent l'importance de ce modèle pour la compréhension des mécanismes de la progression du NASH.

Récemment, Lieber et ses collaborateurs ont mis au point un modèle de diète liquide riche en gras qui, lorsqu'administrée pendant trois semaines à des rats Sprague-Dawley, induit le développement des lésions typiques de la stéatohépatite clinique [44]. Le bilan calorique de cette diète révèle que 71 % de l'énergie totale est dérivée des lipides, 11 % des glucides et 18 % des protéines. Ceci surpasse largement la quantité de graisses que devrait comporter un régime normal moyen, tel que recommandé par l'Institut de Médecine des États-Unis. Or, cette étude a permis de démontrer qu'une diète riche en lipides a des effets beaucoup plus néfastes sur le foie qu'une diète équivalente en apport calorique mais dont le contenu en lipides et en glucides est normal. En effet, selon cette étude les rats ayant consommé la diète lipidique ont développé une stéatose et une hyperinsulinémie marquées, sans toutefois devenir obèses. De plus, une augmentation de la peroxydation des lipides (4-HNE) et du stress oxydatif (CYP 2E1) a été notée ainsi qu'une élévation du niveau de TNF- α , indiquant la présence d'un état inflammatoire. Finalement, un début de fibrose, articulé par une surproduction de collagène de type 1 et une augmentation de l'ARN messager du pro-collagène $\alpha 1$, a été souligné. Somme toute, les rats dans cette étude ont clairement développé une stéatohépatite comprenant tous les facteurs clés et

les atteintes hépatiques attribués à sa pathogénèse et sa progression. L'efficacité frappante de ce modèle en a fait le premier choix pour l'induction du NASH dans l'étude présentée dans ce mémoire.

1.5 APPROCHES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DU NASH

Depuis quelques années, la recherche clinique visant à évaluer divers traitements potentiels pour le NASH a subi une croissance fulgurante. Pourtant, il y a toujours une lacune d'un traitement formel dont l'efficacité a été confirmée par un essai clinique contrôlé, randomisé et faisant preuve d'un échantillonnage suffisant et de paramètres histologiques adéquats.

Une panoplie d'approches thérapeutiques est proposée par les médecins, les scientifiques et les chercheurs en se basant sur le mécanisme pathogénique du NASH et sur les conditions associées à ce dernier. Ces stratégies peuvent être classées sous deux grandes catégories; celles qui visent à modifier les habitudes de vie et celles qui requièrent l'administration d'agents antioxydants, hypolipémiants, insulino-sensibilisateurs ou hépatoprotecteurs.

1.5.1 TRAITEMENTS NON PHARMACOLOGIQUES

1.5.1.1 La perte de poids et l'exercice physique

Puisque l'obésité est, dans 75 % des cas, un préalable au développement du NASH, il n'est point surprenant que la perte de poids et l'exercice physique soient considérés par les professionnels de la santé comme le meilleur moyen non pharmacologique à adopter pour renverser la stéatose et prévenir le développement de la stéatohépatite. Cette correction des mauvaises habitudes de vie améliore la sensibilité à l'insuline et les paramètres histologiques (incluant la fibrose), en plus de normaliser les niveaux d'enzymes hépatiques [88, 89]. Cependant, la perte rapide de poids (plus de 1 kg/semaine) doit être évitée, puisqu'une lipolyse trop accentuée causerait une augmentation de la capture des acides gras libres par le foie ce qui pourrait contribuer à aggraver la maladie. Par conséquent, la perte du poids doit être

modeste, soutenue et concentrée sur l'adiposité abdominale [6]. De son côté l'exercice physique est reconnu pour augmenter la sensibilité à l'insuline [90].

1.5.2 TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

1.5.2.1 Les agents antioxydants

Alors que certains aspects de la pathogénèse du NASH demeurent quelque peu énigmatiques, le rôle catalyseur du stress oxydatif dans ce processus n'est plus à discuter. Par conséquent, les agents qui réduisent le stress oxydatif en neutralisant les radicaux libres avant que ces derniers ne causent des lésions mitochondriales et cellulaires représentent une avenue prometteuse pour le traitement du NASH.

Plusieurs études ont évalué le potentiel thérapeutique des vitamines dans le contexte du NASH. L' α -tocopherol, ou encore la vitamine E, est un puissant agent antioxydant liposoluble qui neutralise les radicaux libres qui s'attaquent aux membranes biologiques. Cette vitamine est efficace contre la peroxydation des lipides, la suppression de la production des cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et l'inhibition de la production de collagène dans le foie [91]. Lors d'une étude clinique ouverte, 11 enfants obèses avec un indice de masse corporelle supérieur à 32 kg/m² ayant reçu de la vitamine E à des doses variant entre 400 et 1200 UI par jour, ont subi une amélioration de leur biochimie hépatique [92]. De plus, une étude japonaise portant sur 12 patients adultes souffrant du NASH a démontré que l'administration de vitamine E à une dose de 300 mg/jour durant un an réduit les niveaux plasmatiques d'ALT et de la cytokine profibrotique TGF- β , en plus de diminuer la stéatose, l'inflammation et la fibrose et de stabiliser les membranes cellulaires [70]. En 2003, Harrison et ses collaborateurs ont effectué une étude à double-insu, randomisée et contrôlée par laquelle ils ont montré qu'un traitement combinant la vitamine E et la vitamine C pendant 6 mois améliore significativement la fibrose hépatique chez des patients souffrant du NASH [93]. La base biochimique de ce concept réside dans le fait que la vitamine C pourrait favoriser la régénération de la

vitamine E, prolongeant ainsi son effet antioxydant. Cependant, l'administration de la vitamine E à doses très élevées pourrait augmenter les risques de mortalité, toutes causes confondues, et devrait conséquemment se faire uniquement sous surveillance médicale professionnelle [94]. L'ensemble de ces résultats suggère que la vitamine E pourrait constituer un support moléculaire intéressant dans la prise en charge du NASH, grâce à sa simplicité d'utilisation, sa grande innocuité et sa tolérance excellente. Néanmoins, les résultats encourageants de ces travaux doivent être confirmés sur des effectifs plus importants de patients.

Il a été observé que plusieurs patients souffrant du NASH présentaient des niveaux élevés d'homocystéine. Cette observation a mené à l'hypothèse que la bétaine, médicament utilisé pour le traitement de l'homocystéurie, pourrait s'avérer efficace comme traitement du NASH. La bétaine est un composant naturel du cycle métabolique de la méthionine reconnue pour augmenter le niveau de SAME, forme active de la méthionine. À son tour, le SAME entre dans le cycle de synthèse du glutathion en plus d'être un donneur de groupement méthyle, nécessaire pour la formation de la phosphatidylcholine, une composante des VLDL qui jouent un rôle prépondérant dans l'exportation des lipides à partir des hépatocytes [95, 96]. Ainsi, un apport supplémentaire en bétaine améliorerait l'extrusion des lipides hors du foie et réduirait donc la stéatose. Huit patients souffrant du NASH et traités avec 20 g de bétaine quotidiennement durant 12 mois ont montré une amélioration significative des niveaux sériques de transaminases, du degré de stéatose, de la nécroinflammation et de la fibrose [95]. De ce fait, la bétaine représente un agent prometteur pour le traitement du NASH qui devra aussi être évalué dans des essais cliniques plus adéquats.

Enfin, le SAME et la N-acétylcystéine, qui augmentent le niveau de glutathion dans les hépatocytes, sont reconnus pour leur potentiel antioxydant. En effet, le SAME exerce une action anti-stéatosique, anti-inflammatoire, antioxydante et anti-fibrotique chez des patients atteints de maladies hépatiques [97]. Par ailleurs, une récente étude a démontré que la N-acétylcystéine atténue le stress oxydatif et améliore les fonctions hépatiques dans un modèle de NASH chez le rat [59]. De plus, une étude clinique a révélé une amélioration du niveau des transaminases hépatiques chez 11 patients

souffrant du NASH et traités avec 1g de N-acétylcystéine par jour durant 3 mois [98]. Par conséquent, ces composés pourraient donc représenter des thérapies éventuelles contre le stress oxydatif à évaluer dans des études cliniques appropriées sur le NASH.

Les derniers agents à traiter dans cette section, mais non les moindres, et qui font également partie des agents cytoprotecteurs sont la silymarine et son composé le plus actif, la silibinine.

Figure 4 : Le *Silybum marianum*. Une plante robuste, de grande taille, dépassant le plus souvent 1 m qui pousse en des lieux secs et ensoleillés tels que sur le pourtour méditerranéen.



Tirés de : http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:YN_Silybum_marianum_93.jpg

Le chardon-Marie (*Silybum marianum*) est la plante médicinale la plus largement utilisée à travers le monde pour ses effets bénéfiques sur le foie [99]. La silymarine est un mélange de flavonoïdes extraits des fruits et des graines de cette plante dont l'efficacité a été démontrée à plusieurs reprises, en ce qui a trait à la protection des hépatocytes contre les dommages induits par une cirrhose, une jaunisse ou une hépatite [100]. Des études *in vitro* et *in vivo* ainsi que des études cliniques ont illustré les effets antioxydants et hépatoprotecteurs de la silymarine et de son composé actif, la silibinine, dans les maladies hépatiques d'origine alcoolique ou non alcoolique [101-107]. *Silybum marianum* est généralement administré sous forme d'extrait encapsulé et standardisé (70-80 % en silymarine) qui est très faiblement absorbé par le

tract digestif. Toutefois, des études menées sur des rats ont permis de développer un complexe de silibinine et de phosphatidylcholine (Siliphos®, Milk Thistle Phytosome®, ou IdB1016®) qui possède une plus grande biodisponibilité [108-110]. En effet, Di Sario et ses collaborateurs ont démontré qu'un complexe de silibinine-vitamine E-phospholipides exerce des effets hépatoprotecteur et anti-fibrotique dans un modèle de maladie hépatique chronique chez le rat [111]. De plus, une étude pilote récente a confirmé l'efficacité de ce complexe pour la réduction de la résistance à l'insuline et des marqueurs de la fibrose hépatique chez des patients ayant des NAFLD [112]. Enfin, des études animales et cliniques ont démontré que la silymarine et la silibinine sont non toxiques, même à très hautes doses, et présentent très peu d'effets secondaires [113]. Toutes ces propriétés font du chardon-Marie et de ses composés actifs des candidats potentiels pour d'éventuels tests cliniques sur le NASH.

1.5.2.2 Les agents hypolipémiants

Les fibrates et les statines sont les principales composantes de ce groupe. Ces agents ont pour fonction de diminuer le contenu hépatique en triglycérides.

Le clofibrate agit en diminuant la synthèse hépatique et en augmentant le catabolisme des triglycérides, réduisant ainsi les taux plasmatiques des chylomicrons et des VLDL. Cet agent a été administré pendant 1 an à une dose de 2 g par jour à un petit groupe de patients atteints de NASH. Aucun changement significatif n'a été rapporté quant à tous les paramètres à l'étude [114]. Par ailleurs, 46 patients NASH recevant 600 mg par jour de gemfibrozil durant 1 mois ont bénéficié d'une baisse des transaminases hépatiques [115]. Cependant, aucune donnée histologique n'a été fournie. Le probucol est aussi un médicament hypolipémiant ayant des propriétés antioxydantes. Cet agent a fait l'objet d'une étude clinique randomisée, contrôlée et à double-insu chez 30 personnes atteintes de NASH recevant 500 mg de probucol par jour ou un placebo durant 6 mois. À la fin de l'étude, il y avait une nette amélioration dans le niveau d'aminotransférases mais aucune donnée histologique n'était disponible [116].

1.5.2.3 Les agents antidiabétiques et insulino-sensibilisateurs

Le lien établi entre le NASH, le diabète et l'insulino-résistance a mené à l'étude de plusieurs médicaments antidiabétiques pour le traitement du NASH.

La metformine est un traitement efficace de l'hyperglycémie à jeun chez les patients diabétiques de type II. Elle agit en réduisant la libération de glucose hépatique via l'inhibition de la néoglucogenèse. Son principal site d'action semble être la mitochondrie où elle agit en stimulant la pyruvate-kinase et l'oxydation des AGL ainsi qu'en inhibant la respiration mitochondriale et l'expression des enzymes lipogéniques [117-120]. Son potentiel bénéfique dans le contexte des maladies hépatiques est de plus en plus étudié.

Lors d'une étude récente, 25 patients atteints de NAFLD, n'ayant pas répondu à un traitement impliquant un changement des habitudes de vie et l'administration de l'acide ursodéoxycholique (UDCA - voir section suivante), ont été traités avec la metformine pendant 6 mois. Une normalisation de la biochimie sanguine et de l'histologie hépatique ainsi que du niveau de l'insuline a été observée suite à ce traitement [121]. Des résultats positifs ont été rapportés par une autre étude chez 20 patients non diabétiques souffrant de NASH, pour lesquels une amélioration de la biochimie et du volume hépatique, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline ont été notées, suite à un traitement avec la metformine [122]. Finalement, une toute récente publication par Oliveira et ses collaborateurs cite une diminution significative des aminotransférases hépatiques, de l'insuline, du glucose, de l'indice de l'insulino-résistance (« Homeostatic Model Assessment-estimated Insulin Resistance » ou HOMA-IR), du degré de la stéatose ainsi que de la fibrose suite à un traitement de 12 mois avec la metformine combinée avec la N-acétylcystéine, chez 20 patients atteints de NASH [123]. Cependant, à cause du risque d'acidose lactique chez les patients souffrant de troubles hépatiques, la metformine ne peut être recommandée avant que son investigation dans des essais cliniques randomisés et contrôlés ne soit complétée.

Les thiazolidinediones (TZDs), incluant la troglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone, améliorent la sensibilité à l'insuline en activant les récepteurs nucléaires PPAR γ chez les adipocytes périphériques. Les TZDs diminuent les niveaux d'acides gras plasmatiques et redistribuent les lipides intracellulaires [124]. De plus, ces agents améliorent la capture du glucose par les muscles squelettiques, réduisent l'adiposité abdominale, favorisent la différenciation des adipocytes et altèrent la masse mitochondriale [125]. Ainsi, cette classe de médicament pourrait contrer la stéatose causée par une insensibilité hépatique à l'insuline.

Le potentiel thérapeutique de la troglitazone a aussi été étudié chez des patients obèses et non diabétiques qui ont montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline après 1 mois de traitement [126]. Une autre étude pilote sur 10 patientes ayant été diagnostiquées avec le NASH et recevant de la troglitazone a démontré une amélioration du niveau d'enzymes hépatiques [127]. Cependant, à cause de l'hépatotoxicité potentielle de la troglitazone, ce médicament a été retiré du marché.

Une étude portant sur le traitement de 30 patients atteints du NASH avec la rosiglitazone (4 mg, deux fois par jour) pendant 48 mois s'est conclue en une amélioration de la stéatose hépatique, du ballonnement hépatocytaire, de la fibrose périsinusoïdale, de la sensibilité à l'insuline et des paramètres biochimiques hépatiques [79].

Dix-huit patients non diabétiques souffrant de NASH ont été traités avec une dose de 30 mg/jour de pioglitazone durant 48 semaines. Cette étude a révélé une amélioration de la biochimie hépatique, du degré de stéatose, des lésions cellulaires, de l'inflammation parenchymateuse et de la fibrose [128]. Une gamme d'effets indésirables peut se manifester concurremment à la prise de ces médicaments. C'est pourquoi des études contrôlées et plus poussées devraient être mises en place.

1.5.2.4 Les agents cytoprotecteurs

Plusieurs agents font partie de ce groupe, les plus connus étant les sels biliaires. Ces derniers sont des détergents qui solubilisent les lipides dans la bile au sein du tube

digestif. Généralement, l'effet détersif des divers sels biliaires varie selon leur hydrophobicité relative. L'acide ursodéoxycholique (UDCA) est un sel biliaire hydrophile connu pour posséder des propriétés antioxydantes [129, 130]. Son efficacité et son innocuité dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive et pour la dissolution des calculs biliaires ont été démontrées [131]. Il est souvent prescrit pour le traitement de la cirrhose primaire d'origine biliaire et d'autres maladies hépatiques choléstatiques ou non choléstatiques [132]. De plus, l'UDCA possède des propriétés cytoprotectrices, anti-apoptotiques, stabilisatrices de membranes cellulaires et immunomodulatrices bien connues [133]. L'UDCA exerce une influence directe sur la concentration du cholestérol dans le sang. Son principal mécanisme d'action repose sur sa propriété hydrophile qui lui permet de compétitionner avec les acides biliaires endogènes hydrophobes et toxiques et de faciliter leur évacuation [133-135].

Plusieurs études cliniques ont démontré qu'en traitant des patients atteints de NASH avec une dose de 10 à 15 mg/kg/jour d'UDCA durant 6 à 12 mois, on observe une amélioration du niveau d'aminotransférases [114, 136, 137] et du grade de stéatose [114]. De plus, l'UDCA s'est avéré efficace pour prévenir la stéatose chez les rats lorsqu'administré à une dose de 25 mg/kg/jour durant 30 jours [138]. Par contre, une plus large étude randomisée et contrôlée, testant l'effet de l'UDCA (13-15 mg/kg/jour) sur 166 patients chez lesquels le NASH a été diagnostiqué par biopsie hépatique, a échoué dans la preuve de son efficacité pour l'amélioration des transaminases hépatiques et de la stéatose en comparaison au groupe placebo [139]. Par ailleurs, l'UDCA a potentialisé l'effet thérapeutique d'une diète faible en calories pour prévenir le développement de NASH induit par la surconsommation de graisses chez le rat [140]. Enfin, une plus récente étude à double-insu, randomisée et contrôlée, portant sur 48 patients souffrant de NASH et traités avec une combinaison d'UDCA et de vitamine E a dévoilé une normalisation du niveau d'enzymes hépatiques et de l'histologie du foie [141]. L'utilité de l'UDCA dans le traitement du NASH reste donc controversée.

Le NCX 1000 est un dérivé de l'UDCA qui possède la propriété de libérer du monoxyde d'azote (NO) spécifiquement au niveau des hépatocytes. Il représente le

résultat d'une liaison entre une molécule de NO et l'UDCA via une molécule d'acide ferrulique. Dans divers modèles animaux de dommages hépatiques, cette liaison est rompue par les estérases cellulaires afin de libérer le NO dans le foie, conférant ainsi au NCX 1000 des effets immunomodulateurs, cytoprotecteurs et anti-apoptotiques [142-147]. Les résultats de notre récente étude *in vitro* ont montré que le NCX 1000 confère une meilleure protection que l'UDCA, à doses équimolaires, aux hépatocytes de souris traités avec de l'amiodarone pour développer des lésions similaires à celles d'une stéatohépatite [148]. De plus, une protection additive a été observée lorsque le traitement comprenait une combinaison du NCX 1000 avec un antioxydant lipophile tel que la vitamine E. Cependant, aucune étude animale ou clinique n'a encore entrepris l'évaluation du potentiel bénéfique du NCX 1000 pour le traitement NASH.

Les agents hépatoprotecteurs ont donc un profil intéressant figurant dans la fiche des traitements potentiels contre le NASH et méritent une plus profonde investigation grâce à des études animales ou cliniques plus poussées. La combinaison de ces agents avec un antioxydant lipophile représente également une voie particulièrement attrayante à examiner.

1.6 MISE AU POINT DU MODÈLE

Plusieurs modèles animaux ont été développés dans le but de mieux caractériser et de mieux comprendre la pathologie du NASH. Dans la présente étude, un modèle *in vivo*, basé sur celui conçu par Lieber et ses collaborateurs en 2004, a été mis au point, afin de mimer les lésions typiques d'une stéatohépatite, par l'administration d'une diète riche en lipides à des rats [44]. Ce modèle attrayant proposé par ces chercheurs stipule le développement d'une stéatose hépatique et de dépôts de collagène accompagnés de lésions nécroinflammatoires, de la production accrue de ROS, de peroxydation lipidique, de résistance à l'insuline et de dysfonction mitochondriale dans le foie de rats Sprague-Dawley, suite à l'ingestion d'une diète liquide riche en gras, durant 3 semaines. Malgré plusieurs tentatives visant à reproduire ce modèle et tout en respectant scrupuleusement toutes les consignes suggérées personnellement par les créateurs mêmes du modèle en question, les lésions espérées d'une stéatohépatite n'ont pas été rencontrées.

Or, la mise au point de ce modèle s'est poursuivie en prolongeant la durée du traitement sur plusieurs semaines, voire mois, avant d'atteindre le degré de lésions hépatiques souhaité pour cette étude. Le résultat était tel qu'après six semaines et allant jusqu'à douze semaines d'ingestion de la diète liquide riche en gras, les rats développaient une stéatohépatite non alcoolique comprenant les traits mentionnés plus hauts, situation semblable à la réalité humaine de nos jours. Un aperçu de la condition hépatique des rats ayant reçu la diète riche en lipides pendant six semaines est illustré aux figures 5 et 6 afin de permettre une meilleure appréciation des résultats présentés dans les prochains manuscrits. En effet, un état général de stéatose macrovésiculaire et d'infiltration de cellules inflammatoires prédominait chez ces rats (*Figure 5*). De plus, quelques paramètres cardinaux, tels que la peroxydation des lipides, la production de GSH et la relâche de LDH mesurés dans ces foies, ont fourni des indices importants quant à la détermination du moment opportun pour commencer les traitements. Effectivement, l'élévation de ces paramètres reflète le début d'une stéatohépatite à la

sixième semaine (*Figure 6*). Par ailleurs, le prolongement de la durée de l'ingestion de la diète grasse jusqu'à huit, dix et douze semaines nous a indiqué que les lésions de la stéatohépatite s'aggravaient en fonction du temps (résultats non présentés). Or, sachant qu'avant la sixième semaine les lésions hépatiques étaient trop peu importantes pour invoquer une stéatohépatite et que notre intention initiale était de traiter la maladie, il était incontestable qu'il fallait commencer les traitements à partir de ce moment.

Figure 5 : Effets de l'ingestion de la diète grasse pendant 6 semaines sur les paramètres histologiques. Coupe histologique d'un foie de rat illustrant la présence de stéatose macrovésiculaire et d'infiltration marquée de cellules inflammatoires (Coloration HPS, agrandissement 10x)

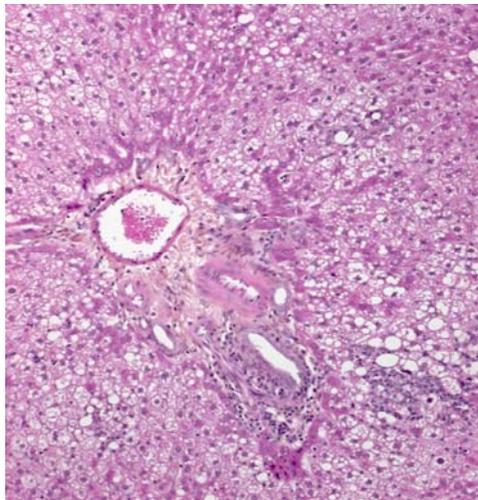
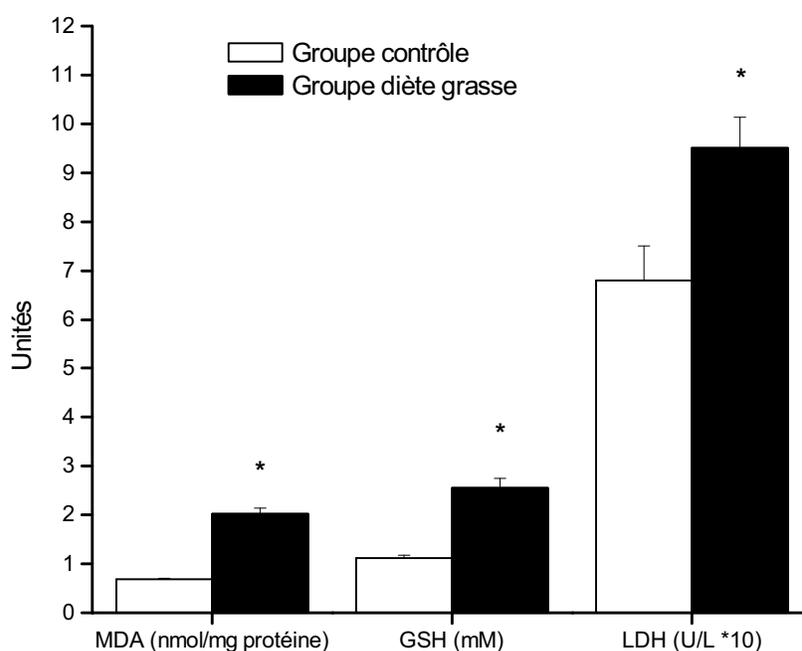


Figure 6 : Effet de l'ingestion de la diète grasse pendant 6 semaines sur certains paramètres tirés de la mise au point du modèle NASH chez le rat. Le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion (GSH) ont été mesurés dans des morceaux de foie frais alors que le lactate déshydrogénase (LDH) a été mesuré dans le plasma, tous provenant de rats ayant ingéré une diète standard (Groupe contrôle) ou une diète riche en gras (Groupe diète grasse) pendant 6 semaines. Les valeurs sont exprimées par des moyennes de $n = 4$ rats \pm ES. * $P < 0.05$ versus le groupe contrôle.



1.7 BUT DE L'ÉTUDE

Dans les pays prospères, de nouvelles habitudes de vie ont conduit à l'émergence de l'obésité et des maladies reliées à la stéatose hépatique, qui peuvent évoluer en stéatohépatite chez certains patients. Malgré son caractère asymptomatique, la stéatohépatite non alcoolique touche plus de 3 % de la population générale et représente la maladie chronique du foie la plus répandue dans les pays de l'Ouest.

Plusieurs cercles vicieux impliquant la peroxydation des lipides, la formation de ROS, la dysfonction mitochondriale, la déplétion des antioxydants et la génération de cytokines inflammatoires peuvent induire la fibrose hépatique qui peut éventuellement aboutir en cirrhose terminale.

Bien que la dernière décennie ait connue un essor important des études portant sur les causes, la pathogénèse et les conséquences de la stéatohépatite non alcoolique, certains aspects pathophysiologiques de la maladie restent énigmatiques à ce jour. Une multitude de voies thérapeutiques a été investiguée pour le traitement du NASH mais aucun remède efficace, appuyé sur des études expérimentales et cliniques, n'a encore été généralement établi.

L'objectif de cette étude portait donc sur l'évaluation du potentiel bénéfique de certains agents antioxydants et cytoprotecteurs sur ce modèle expérimental de NASH chez le rat et se divise en deux sous-parties selon les composés à l'étude. La première concerne le traitement des lésions de la stéatohépatite avec l'UDCA et son dérivé le NCX 1000, qui possèdent des effets cytoprotecteurs connus sur le foie. Il importait ainsi de trouver la dose optimale de NCX 1000 à utiliser dans le contexte du NASH, en évaluant les paramètres histologiques et physiologiques en fonction de la dose et en comparaison avec les effets de la molécule-mère, l'UDCA. De plus, il était question d'évaluer l'effet de la combinaison d'une moindre dose de NCX 1000 avec la vitamine E, puissant antioxydant hydrophobe. La seconde sous-division implique le traitement des affections du NASH expérimental avec la silibinine, molécule polyphénolique

active du chardon-Marie, possédant des propriétés antioxydantes et hépatoprotectrices bien documentées, sous forme de phytosome, complexe de silibinine et de phosphatidylcholine servant à augmenter l'absorption de la molécule en question.

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

Le premier manuscrit sera soumis en novembre à la revue scientifique *American Journal of Gastroenterology* et le second manuscrit sera soumis en novembre à la revue scientifique *Journal of Ethnopharmacology*. L'ensemble des manipulations a été réalisé par l'auteure de ce mémoire avec l'aide précieuse de Diane Vallerand et d'Antoine Brault.

CHAPITRE II: LE PREMIER MANUSCRIT

NCX 1000 ALONE OR IN COMBINATION WITH VITAMIN E REVERSES EXPERIMENTAL NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IN THE RAT

Haddad Yara¹, Vallerand Diane¹, Brault Antoine¹, Spénard Jean²

and Haddad Pierre S¹.

¹ Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

² Axcan Pharma Inc, Mont-St-Hilaire, Québec, Canada

Running head: NCX 1000 in NASH.

ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a serious liver condition related to the metabolic syndrome whose prevalence is drastically rising in developed countries and worldwide. We explored the therapeutic effect of NCX 1000, a derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA) with nitric oxide (NO) donating properties, alone or in combination with vitamin E, in an experimental model of NASH in the rat. A control group was fed a standard liquid diet (Control), and the NASH groups were fed a high-fat liquid diet for 12 weeks without (NASH) or with simultaneous daily gavage with either NCX 1000 at 15 or 30 mg/kg (N15 and N30 respectively), or N15 plus vitamin E 100 mg/kg (N15+VitE) for the last 6 weeks; UDCA 17.2 mg/kg was used as a reference. NASH rats developed all key features of the disease. Treatments with N30 or UDCA improved liver histology, decreased lipid peroxidation and completely suppressed increases in LDH release, plasma insulin, and TNF- α . They also decreased O₂⁻ release, returned liver weight and glutathione back to normal. The N15 treatment was less efficient than the N30 group, but became comparable to the latter when combined to vitamin E. Our study demonstrates that NCX 1000 at low doses has potent cytoprotective, antioxidant, and hypoinsulinemic properties that can be enhanced by combination with lipophilic antioxidants like vitamin E. This compound has therefore the potential for being developed for the treatment of NASH. Clinical evidences are needed.

Keywords: Metabolic syndrome, oxidative stress, steatosis, high-fat diet, insulin resistance.

INTRODUCTION

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) was characterized for the first time by Ludwig and colleagues in 1980 (38) as the inflammatory stage following reversible steatosis in the liver. It is part of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) spectrum, which is now the most common cause of hepatic illness. NASH is more likely to develop in sedentary inactive people, following high-fat/high-caloric diets, notably in possible association with visceral adiposity. It is strongly related to the metabolic syndrome (MS), being its hepatic expression, and to type II diabetes mellitus (40, 41, 51). Although the pathogenesis of NASH is not entirely elucidated, it is now well established that it involves a multiple-hit process (10). This includes insulin resistance and oxidative stress and underlies the development of macrovesicular steatosis, necroinflammatory lesions, Mallory body formation, hepatocyte ballooning, and collagen deposition (4, 45). Furthermore, elevated inflammatory cytokines and adipokines, increased lipid peroxidation products, and increased reactive oxygen species play a major role in the pathogenesis of NASH (43). These characteristics, found in patients with no major alcohol intake history (less than 140 g/week for men and 70 g/week for women) (13), are shared by patients with alcoholic steatohepatitis (ASH). Several remedies were investigated for the treatment of NASH but an efficient therapy has yet to be developed.

UDCA is a hydrophilic biliary acid known to possess antioxidant properties (5, 35). Its cytoprotective, anti-apoptotic, membrane stabilizing and immunomodulative effects have also been acknowledged (1). It is presently approved for the management of primary biliary cirrhosis and other cholestatic and noncholestatic liver diseases (27). Several clinical studies have shown that treating NASH patients with UDCA (10 to 15 mg/kg) for a 6-12 months period improved aminotransferase levels (19, 29) and grade of steatosis (29). However, a larger randomized controlled trial using UDCA on 166 patients with biopsy-proven NASH for 2 years failed to show improvement in transaminase levels and in steatosis beyond that found in the placebo group (34). In contrast, a more recent double-blind random-controlled study on 48 NASH patients that were given UDCA with vitamin E revealed improved aminotransferase levels and liver histology (11). At last, UDCA was

found effective in enhancing the therapeutic effects of low caloric diet to prevent fat-induced NASH in the rat (12).

NCX 1000 is a derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA) with nitric oxide (NO) donating activity that was reported to be efficacious in animal models of liver injury due to its immunomodulatory, cytoprotective and anti-apoptotic properties (14-18, 36). Results from our previous *in vitro* published study show that NCX 1000 exerts a better protective effect than UDCA on mouse hepatocytes treated with amiodarone to produce NASH-like lesions (49). Moreover, additive protection was observed with a combination of NCX 1000 and lipophilic antioxidants such as vitamin E. However, no animal or clinical studies have yet assessed the potential benefit of NCX 1000 for the treatment of NASH.

Several models have been used to experimentally reproduce NASH. Models are either based on genetic deficiencies (32, 56), on methionine and choline deficient (MCD) diet (46, 50), or on high-fat diets (7, 57) in murine rodents. In 2004, Lieber and colleagues developed a high-fat liquid diet that, when given to rats, triggered the key features of NASH including steatosis, collagen deposition, necroinflammatory lesions, insulin resistance, oxidative stress and mitochondrial dysfunction (33). We therefore selected this diet-induced model to induce NASH in Sprague-Dawley rats over 12 weeks, since this procedure adequately approximates the human condition, given that NASH strongly correlates with a fat-rich sedentary life-style in obese and non-obese patients (13).

Thus, based on the previous encouraging *in vitro* results and using the Lieber model, we tested NCX 1000 and used UDCA at a high dose as comparator. We also assessed the effect of combining lower dose of NCX 1000 with vitamin E and evaluated the impact of all treatments on oxidative stress, inflammation, and the metabolic syndrome parameters.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, USA). UDCA and NCX 1000 were graciously provided by Axcan Pharma Inc. (Mont-St-Hilaire, Qc, Canada).

Animals and experimental protocol

Male Sprague-Dawley rats (75-100g) were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec). They had access to normal rat chow diet and water for 5 days before the beginning of experimental protocols. They were then randomly double-housed and divided into 2 groups of 6 rats and 4 groups of 10 rats. The control group (Control, $n=6$) was fed the Lieber-DeCarli standard liquid diet (Dyets Inc., Bethlehem, PA) for 12 weeks. The nonalcoholic steatohepatitis group (NASH, $n=6$) received the Lieber-DeCarli high-fat liquid diet (Dyets Inc., Bethlehem, PA) for 12 weeks. The treatment groups ($n=10$, each) were fed the same high-fat diet for 12 weeks to which was added the following respective treatments during the last 6 weeks; NCX 1000 30 mg/kg (N30), NCX 1000 15 mg/kg (N15), UDCA 17.2 mg/kg (UDCA), and NCX 1000 15 mg/kg combined with vitamin E 100 mg/kg (N15+VitE) daily by intragastric gavage in a 0.5 % methylcellulose solution. The UDCA dose of 17.2 mg/kg corresponds to the upper normal therapeutic range for that drug in clinical studies. In term of UDCA content, it is equivalent to that of 30 mg/kg of NCX 1000. In preliminary experiments, a 60 mg/kg dose of NCX 1000 was tested and showed loss of beneficial effects (data not shown), probably due to a solubility issue. No further experiments were carried out using this dose. Diets were prepared fresh on a daily basis. The Lieber-DeCarli standard liquid diet contains 35% of energy derived from fat, 18% from protein, and 47% from carbohydrates. The fat content of this diet is equivalent to that found in an average normal US diet and is classified as 'healthy' by the Institute of Medicine, according to Lieber et al. (33). In contrast, the high-fat diet contains 71% of energy derived from fat, 18% from protein, and 11% from carbohydrates (33).

The weight of animals and their food consumption were monitored weekly. All animals were fed the diets *ad libitum* and kept with controlled temperature and humidity, under a 12:12-hr light-dark cycle. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Canadian Council on the Care of Animals and approved by the University's Ethics Committee.

Liver isolation

Overnight fasting rats underwent laparotomy after they were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg b.w., intraperitoneally) and the portal vein was cannulated. Blood was collected via the inferior vena cava and blood glucose was directly evaluated using a commercial glucometer (One Touch Ultra, LifeScan, Johnson & Johnson, Milpitas, CA). Livers were flushed with Krebs-Henseleit (NaCl 0.9%, KCl 4.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 2.1 mM, pH 7.4, 22°C) buffer for 3 minutes then removed and weighed. Thereafter, liver dissection was performed. Pieces from the median lobe were placed in a 10% formalin solution for histopathological analysis. Other tissue samples were used fresh for biological determinations (see below) or immediately frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until use.

Histology

Histological sections and hematoxylin phloxine saffron staining (HPS) were done by the Department of Histology of St-Justine's Children Hospital (Montreal, Qc, Canada). Each section was scored for steatosis based on the percentage of hepatocytes containing macrovesicular fat and according to published criteria (grade 0: absent; grade 1: less than 33%; grade 2: 33-66%; grade 3: more than 66%) (3, 26). Inflammation was expressed as the mean of pro-inflammatory infiltrating cell counts in 10 randomly selected areas (at 400X) within each slide using the following scale (0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: severe) (3). We evaluated Mallory bodies and collagen deposits (using HPS staining) as present or absent. Pictures were taken using Axio-imager electronic microscope (z1 Zeiss, Jena, Germany) and Axio-vision 4.2 software.

Blood parameters

Plasma transaminase (ALT and AST) levels, lactate dehydrogenase (LDH), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL) were measured by the Department of Biochemistry of St-Justine's Children Hospital (Montreal, Qc, Canada). Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) was assessed using Quantikine Rat TNF- α Immunoassay kit (R&D Systems, MN, USA). Serum adiponectin measurements were performed using Rat Adiponectin ELISA Kit (AdipoGen, Seoul, Korea). Plasma insulin was evaluated with the Rat Insulin Radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research, St. Charles, MO). The HOMA index was calculated using insulin and glucose values with the following formula: (Fasting insulin (mU/L) x fasting blood glucose (mmol/L) / 22.5) (21).

Mitochondria isolation

Mitochondria were isolated from 1 g of fresh liver as described by Johnson and Lardy (23). Briefly, tissue was homogenized on ice using a Teflon potter homogenizer in the isolation medium containing sucrose (250 mM), Tris-base (10 mM), EGTA (1 mM), pH 7.2 at 4°C. To remove cellular fragments, homogenate was centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C. Supernatant was collected and centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The pellet was then softly washed once with the same medium, centrifuged, and washed another time with the isolation EGTA-free medium and centrifuged again. The final pellet, containing viable mitochondria, was suspended in this last medium and stored on ice. Protein content was determined according to the Lowry method (37).

Oxidative stress assessment

Liver lipid peroxidation was determined by measuring the MDA levels, applying the thiobarbituric acid (TBA) method with a few modifications. Briefly, fresh liver (0.5 g) was homogenized on ice using a Teflon potter homogenizer and a polytron in a sucrose buffer (4.5 ml, 250 mM). Homogenate was centrifuged at 2000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected and protein content was determined using the Bradford method. Supernatant (200 μ l) was added to a vial containing an

8.1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate solution (200 μ l), a 20 % (v/v) acetic acid solution (pH 3.5) (1.5 ml), a 0.8 % (w/v) TBA solution (1.5 ml) and distilled water (600 μ l). Vials were heated at 95°C for 45 min and cooled on ice for 2 min. After butanol (4 ml) was added, all vials were mixed for 15 min and centrifuged at 1000 g for 10 min. Supernatants (200 μ l) were transferred into a 96 well plate and TBARS were estimated by measuring fluorescence (λ_{ex} =530 nm; λ_{em} = 590 nm) using a multilabel counter model Wallac Victor² (PERKIN ELMER, Woodbridge, ON). The data were compared to a standard curve of MDA (0 to 84 μ M) and results were expressed as nmol MDA/mg of protein.

Lucigenin-amplified chemiluminescence was used to determine superoxide anion in liver tissue following the procedure described by Oliveira and colleagues (47). Briefly, a frozen liver fragment was incubated at 37°C for 15 min in an oxygenated (95 % O₂-5 % CO₂) Krebs-HEPES buffer containing NaCl (118.3 mM), KCl (4.69 mM), CaCl₂ (1.87 mM), MgSO₄ (1.2 mM), KH₂PO₄ (1.03 mM), NaHCO₃ (25 mM), glucose (11.1 mM) and Na-HEPES (20 mM), pH 7.4. The fragment was then put into a scintillation vial containing 2 ml of this buffer, supplemented with lucigenin (250 mM). A scintillation counter (Wallac 1409 Model, PERKIN ELMER LIFE SCIENCE, St-Laurent, QC), adjusted for single-photon emission recording mode, was used for counts appraisal during a 15 min period. Data were obtained from the area under the counts versus time curve and expressed as a function of the dry tissue weight (mg).

Reduced glutathione

Fresh liver (0.5 g) was minced and homogenized on ice using a polytron in 1 ml of a metaphosphoric acid solution (5 %) prepared daily. Homogenate was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. Supernatant was used for reduced glutathione (GSH) measurement using the Bioxytech GSH-400 Assay Kit (OXIS INTERNATIONAL INC, Portland, OR) according to the manufacturer's instructions. Absorbance at 400 nm was assessed using an Ultrospec[®] 2100 pro spectrophotometer (BIOCHROM, Cambridge, England). The data were compared to a standard curve of reduced GSH (0-90 μ M).

Mitochondrial ATP

Freshly isolated mitochondria (100 μ l) were added to ice-cold HClO₄ (900 μ l, 1M). Centrifugation was done at 2 000 g for 10 min at 4°C and supernatant (100 μ l) was neutralized with KOH (47 μ l, 2M) and Tris-HCl (853 μ l, 100 mM). Measurement of bioluminescence was carried out with the ATP Bioluminescent Assay Kit (SIGMA, Oakville, ON) according to the manufacturer's instructions using a multilabeled counter model Wallac Victor² (PERKIN ELMER, Woodbridge, ON). The data were compared to a standard curve of ATP from 0 to 80 μ M and results were expressed in μ mol ATP/g of protein.

Western blot analysis

Western blots on total liver homogenate were performed with a rabbit polyclonal anti-PPAR- α primary antibody (1:400) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA). Liver microsomal fraction was also used in western blot with mouse monoclonal anti-rat P450 CYP2E1 antibody (1:1000) (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI). Secondary antibodies used are the following: a goat polyclonal anti-rabbit (1:100 000) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore, PA) and a goat anti-mouse (1:4000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence system following the manufacturer's instructions GE Healthcare (ECL Western Blotting Detection Reagents, Buckinghamshire, UK). Bands quantification was achieved using ImageJ 1.37v (NIH, USA).

Statistical analysis

All results were expressed as means \pm SE. Group means were compared by one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test (and the Chi square test for histological contingency table) using StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc. NC). A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Changes in body weight and liver weight

After 12 weeks of the NASH-inducing fat diet, there were no significant differences in body weight (BW) or weight gain (WG) between groups (Table I). The liver weight (LW) decreased significantly and exclusively in the UDCA and the N30 groups compared with the NASH group ($P < 0.05$). Furthermore, liver index (LW/BW x 100) increased very significantly in the NASH group as compared to the control group and decreased significantly in all treatment groups ($P < 0.05$) (Table I).

Glycemic homeostasis

The high-fat diet did not induce a fasting hyperglycemic effect on rats in the NASH group as compared to the control group. However, UDCA and N30 treatments had a significant lowering effect on plasma glucose as compared to the NASH group (Fig 7. panel A, $P < 0.05$). In contrast, the NASH treatment caused a hyperinsulinemic state as compared to the control group (plasma insulin values of 5.56 ± 1.09 and 3.26 ± 0.31 $\eta\text{g/ml}$, respectively; Fig. 7. panel B, $P < 0.05$). This situation was associated with a substantial increase in insulin resistance, as demonstrated by the significantly greater value of HOMA-IR in NASH animals as compared to control congeners (Fig. 7. panel C, $P < 0.05$). Both plasma insulin and HOMA-IR values were decreased significantly by all drug intervention groups as compared to NASH treatment (Fig. 7. panels B and C, $P < 0.05$). Indeed, values in UDCA, N30, N15 and N15+VitE groups were not statistically different from each other as well as from control animals.

Biochemical parameters

Plasma transaminases (ALT, AST) were not significantly affected by any of the treatments (Table II). The level of LDL rose significantly in the NASH group as compared with the control group ($P < 0.05$). The N15 treatment reduced significantly this parameter ($P < 0.05$). Triglycerides were lowered by NASH induction as compared to the control group and none of the treatments was able to correct this parameter. In contrast, serum LDH was increased by NASH treatment

as compared to the control group ($P < 0.05$) and UDCA, N30 as well as N15 treatments succeeded in returning this parameter to control values ($P < 0.05$) (Table II).

Histological evaluation

Liver histology is currently the gold standard test for the diagnosis of NASH. Liver sections from rats in the control group (Fig. 8. panel A) showed normal morphological features. The tissues of all animals from the NASH group (Fig. 8. panel B) were found to exhibit macrovesicular steatosis of grade 2 or 3 confirming that more than a third of hepatocytes contained macrovesicular fat (Table III; $P < 0.05$ Chi square test). Moreover, Mallory bodies and collagen deposits were encountered exclusively in a number of samples from the NASH group. All treatments yielded statistically significant improvements in histology. As compared to NASH animals, 60 to 70 % of rats in groups treated with UDCA, NCX 1000, or NCX 1000 combined with vitamin E had less than a third of hepatocytes containing macrovesicular fat (Fig. 8, panels C to F; Table III, $P < 0.05$ Chi square test). The infiltration of inflammatory cells in hepatic tissue was very seldom seen in control animals. In contrast, 100 % of NASH animals suffered from moderate to severe inflammatory cell infiltration, a significant change from control animals (Table III, $P < 0.05$ Chi square test). UDCA and N30 treatments improved this parameter (Table III, $P < 0.05$ Chi square test). Reducing the dose on NCX 1000 with or without combination with vitamin E yielded a similar and significant beneficial effect.

Inflammatory cytokines and adipokines

TNF- α is an inflammatory cytokine produced by adipose tissue and macrophages (including liver Kupffer cells). It is known to impair insulin signaling, leading eventually to insulin resistance. In the NASH group, plasma TNF- α was significantly higher than in the control group (Fig. 9. panel A; 36.3 ± 9.3 vs. 13.5 ± 6.4 $\mu\text{g/ml}$, respectively; $P < 0.05$). Conversely, all drug treatments diminished circulating TNF- α level significantly as compared to the NASH group ($P < 0.05$). Adiponectin is a hormone secreted by adipose tissue that is known to decrease during fatty liver disease and the metabolic syndrome. Indeed, the high-fat NASH

treatment induced a significant reduction in serum adiponectin as compared to the control group (Fig. 9. panel B; $P < 0.05$). All drug treatments, notably the N30 group, had a tendency to increase circulating adiponectin.

Oxidative stress

Twelve weeks of the NASH-inducing high-fat diet caused hepatic malondialdehyde (MDA) levels, a product of lipid peroxidation, to more than quadruple as compared to the control group (4.87 ± 1.03 versus 0.74 ± 0.08 $\mu\text{mol/mg}$ of protein, respectively; $P < 0.05$, Fig. 10. panel A). UDCA treatment during the last six weeks normalized liver MDA levels. N30 treatment gave similar results to UDCA but better than N15, suggesting a good dose-effect correlation. When vitamin E was combined with N15, MDA levels decreased to levels slightly below those of the control group.

The superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), an important reactive oxygen species (ROS), is produced by the liver during oxidative stress. Fig. 10. panel B shows that the level of hepatic $\text{O}_2^{\cdot-}$ exhibited a near two-fold increase in the NASH group as compared to the control group ($4\ 506 \pm 440$ and $2\ 186 \pm 183$ AUC/mg dry tissue, respectively; $P < 0.05$). All treatments decreased $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels significantly, although this decrease was less important with the N15 treatment.

Hepatic reduced glutathione (GSH) is a potent antioxidant produced by the liver as a mechanism of intracellular defense. As illustrated by Fig. 10. panel C, GSH level was significantly elevated in the NASH group when compared with the control group (17.4 ± 0.6 vs. 10.0 ± 0.4 mmol/g of protein, $P < 0.05$). These results are demonstrative of the stress induced by a 12-week high-fat diet. All treatment groups significantly diminished hepatic glutathione to levels similar to that of the control group ($P < 0.05$).

Mitochondrial dysfunction

As shown in Fig. 11, hepatic mitochondrial ATP level was lower in the NASH group than in the control group ($P < 0.05$). This is indicative of cellular energetic imbalance caused by a 12-week high-fat diet. All drug treatment groups yielded ATP values that were statistically similar to both the NASH and the control groups, but with a trend towards normalization.

Expression of CYP2E1 and PPAR- α

The expression of the metabolizing enzyme cytochrome P450 CYP2E1 is upregulated by the overproduction of ketones, which is due to impaired mitochondrial β -oxidation as well as increased peroxisomal β -oxidation and microsomal ω -oxidation of free fatty acids (FFAs) in hepatocytes. Western blots showed that the microsomal expression of cytochrome P450 CYP2E1 was increased after 12 weeks of high-fat diet in livers from the NASH group (98 % above control, $P < 0.05$). CYP2E1 expression in the drug treatment groups, except in that of N15 + Vit E, was lowered to values close to those of the control group, but this difference was not statistically significant from the NASH group (Fig. 12. panel A).

The expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), a transcription factor responsible for the activation of fat metabolism genes, was significantly decreased in the livers of NASH animals as compared to values observed in the control group (33 % of control, $P < 0.05$), but was not affected significantly by any treatment in our study when compared to the NASH group as shown by the representative western blots (Fig. 12. panel B).

DISCUSSION

NASH is a threatening liver disease that can progress through fibrosis and cirrhosis. It has been associated with the metabolic syndrome and its incidence is thus following a similar expanding trend, reaching 3 % of worldwide populations (13). At present, no efficient remedy exists. Treatment is still centered on major lifestyle changes (weight loss, healthy eating, exercise), with emerging therapeutic avenues focused on improving insulin resistance, reducing inflammation as well as oxidative stress. In the search for potential novel and beneficial treatment options, NCX 1000 and UDCA have attracted our attention. Indeed, these substances exert a wide spectrum of beneficial effects in the liver.

NCX 1000 is a derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA) with nitric oxide (NO) donating properties, which was first found to be effective against Fas-mediated liver injury due to its anti-apoptotic activity (18). It can also lower norepinephrine-induced intra-hepatic resistance (14, 16) and reduce portal hypertension in CCl₄ (17) and methoxamine-treated (36) cirrhotic rats. On the other hand, NCX 1000 was shown to decrease the liver injury and mitochondrial dysfunction induced by acetaminophen in mice (15). Finally, we recently used amiodarone-induced NASH-like lesions in mice hepatocytes *in vitro* to demonstrate that NCX 1000 exerts potent cytoprotective properties, dramatically enhanced when the compound is combined with lipophilic antioxidants like vitamin E (49). We therefore evaluated the beneficial effect of NCX 1000, combined or not to vitamin E, in an experimental *in vivo* rat model of NASH and used UDCA, as a reference.

As mentioned previously, we selected the NASH model recently developed by Lieber and colleagues that is based on the consumption of a high-fat liquid diet and reproduces the majority of the clinical expressions of the human disease (33). Our results confirmed that a 12-week treatment on such high-fat liquid diet triggered all the salient features of NASH starting with hepatomegaly and histologically proven hepatic steatosis. We also observed other previously reported hallmark histological features of NASH such as hepatocyte ballooning, infiltration of inflammatory immune cells (leukocytes and polymorphonuclear neutrophils), Mallory bodies, and collagen deposition (2, 4, 9, 31, 45). As also seen in the clinical setting, the

body weight of NASH animals was not changed. Indeed, NASH is associated with visceral adiposity rather than overall obesity (13, 52) and, although obesity is a risk factor for NASH, not all patients are obese (48). Likewise, liver enzymes were unaffected, as previously observed in a number of clinical studies (2, 42, 44). Insulin resistance, a recognized strong predictor of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) (39, 40, 54, 55), was also evident from the hyperinsulinemia and increased HOMA-IR index of our NASH animals; it is known to enhance lipid accumulation in the liver and thus plays a major role in promoting steatosis (8, 51). Moreover, oxidative stress was clearly demonstrated in our NASH animals by augmented lipid peroxidation (MDA production), increased ROS production (superoxide anion), enhanced antioxidant defense (GSH), and microsomal CYP2E1 over-expression (major catalyst of oxidative stress (6, 53)). Mitochondrial dysfunction was also indicated in our model by decreased ATP production (59). Finally, inflammation was confirmed by adipokine markers, namely the previously reported increased plasma TNF- α and decreased serum adiponectin (24, 25), which are also associated with insulin resistance (22). Hence, the Lieber rat model of NASH adequately reproduced the human disease. Furthermore, in preliminary studies, the cardinal histological features of NASH (steatosis, inflammation and fibrosis) were already present after six weeks of the Lieber diet, in accordance with the original description of the model (33). We therefore began treatments at that time point, with the intention of treating the disease.

In our study, NCX 1000 was administered at doses of 15, 30 and 60 mg/kg. In preliminary experiments, the 60 mg/kg dose showed no efficacy, probably due to solubility issues and it was therefore discarded from the final experimental series. The dose of 30 mg/kg was selected because providing a theoretical amount of UDCA equivalent to 17.2 mg/kg, which lies only slightly higher than the normal human therapeutic range for that drug (5-15 mg/kg) (58). As shown by results of the N30 experimental group, NCX 1000 treatment for six weeks was very efficient at reversing the development of NASH, despite the continued intake of the high-fat diet. Indeed, the histological grade of steatosis was dramatically improved. This was consistent with indices of insulin resistance, which showed normalization of insulinemia and of HOMA-IR. However, perturbations in blood lipids (notably

increased LDL cholesterol) and PPAR- α observed in NASH animals were not corrected by N30 treatment, suggesting that this drug has no direct action on lipids metabolism. Nonetheless, N30 treatment successfully normalized all measured parameters of hepatic oxidative stress (lipid peroxidation, ROS production, glutathione content). This was consistent with the return of circulating LDH toward the normal values observed in control animals and the tendency for normalization of microsomal CYP2E1 expression. Histological evidence of necrosis or fibrosis was also not observed in the livers of N30 animals. Such antioxidant, cytoprotective and anti-fibrogenic effects of NCX 1000 are in line with previous reports (15, 18), including our own studies using an amiodarone-induced NASH-like *in vitro* model (49). NCX 1000 treatment at a dose of 30 mg/kg was also efficient at correcting NASH-induced inflammation, as seen by the significant histological improvement in immune cell infiltration and by the reduction in circulating TNF- α . The decrease in plasma TNF- α was accompanied by a tendency for serum adiponectin levels to rising back toward normal control values, and these parameters may certainly have contributed in restoring insulin sensitivity in N30 animals (22, 28). The treatment with a lower dose of NCX 1000 (N15) seemed to be less efficient, although not statistically different, than N30, notably in terms of histological parameters, LDH release, MDA and O₂⁻ production, suggesting that this drug act in a dose dependent manner for these parameters, in the NASH model used. For all other parameters, N15 had very similar effects to those of N30.

We also assessed the combination of our drug therapy with natural antioxidants, in a rationale to diminish the dose of the chemical drug, hence to reduce the risk of adverse reactions. Vitamin E (α -tocopherol) is a lipophilic antioxidant widely known for its beneficial effects on NAFLD. In fact, it reduces lipid peroxidation, improves fibrosis, attenuates inflammation, and stabilizes membranes due to its lipid solubility (20, 30). It has already been combined with UDCA in a small-scale clinical study for the treatment of NASH and improved liver steatosis and transaminase levels as compared to UDCA with placebo (11). We also recently showed that vitamin E significantly enhanced the antioxidant and cytoprotective potential of NCX 1000 in cultured hepatocytes with NASH-like lesions (49). Results of the present study show that the association of vitamin E with N15

significantly enhanced the beneficial effects of NCX 1000 toward NASH-induced lesions, especially at the level of lipid peroxidation and superoxide anion production, providing similar results to higher dose N30 and UDCA high dose. Thus, vitamin E offered an additional antioxidant protection to that of the N15 group alone; thereby confirming that vitamin E's main target in experimental NASH is oxidative stress. Overall, our results thus clearly demonstrate the promising potential of NCX 1000 in the treatment of NASH and suggest that the dose can be lowered if the drug is combined with vitamin E. Further studies are needed to characterize precisely the ratio between NCX 1000 and vitamin E needed to obtain the maximum effect with the lower doses.

Finally, we examined the effects of UDCA, as a reference. At a clinically relevant dose of 17.2 mg/kg, UDCA exerted antioxidant, anti-inflammatory, cytoprotective, and insulin sensitizing activities as efficient as NCX 1000. In the liver, NCX 1000 is supposed to be metabolized to release a NO donating group and an equimolar amount of UDCA. The higher dose N30 is theoretically providing an equivalent amount to the UDCA dose tested. Since the majority of the effect analyzed was obtained at maximum level (normalization towards control value), it has not been possible to differentiate the two treatments, as it was possible in our previous *in vitro* study (49), where equimolar NCX 1000 afforded better protection than UDCA to mouse hepatocytes treated with amiodarone to produce NASH-like injuries. Obviously, comparing *in vitro* studies to *in vivo* experiments is not always linear; however since the lower dose N15 provided, on almost all parameters, results statistically not different from the N30 dose or UDCA, it would be possible to speculate that NCX 1000 is more active than UDCA in controlling NASH damaging change in several biochemical and cellular parameter. Further studies will be however necessary to identify precisely a dose related effect and which dose could be the more interesting to be coupled with vitamin E.

In conclusion, our study demonstrates for the first time that a therapeutic treatment with high dose NCX 1000 is effective in reducing steatosis, inflammation, oxidative stress and insulin resistance in an *in vivo* rat model of diet-induced NASH. It also confirms that UDCA, at high therapeutic doses, is efficient in controlling the same parameters. The important finding of the study is that lower

doses of NCX 1000 may be as effective, and this could be due to the participation of NO donation to the control of the parameters, such as oxidative stress (as seen in our published study *in vitro*) (49). In addition, the results of our study support the use of combinations of lower doses of NCX 1000 with natural antioxidants, such as vitamin E, as an option for the treatment of NASH. Further studies are needed for a complete assessment of the synergistic or additive effect of NCX 1000 with antioxidant vitamins. A clinical validation of this approach will remain mandatory.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Axcan Pharma Inc. (Mont-Saint-Hilaire, Qc, Canada). Y.H. received a partial graduate studentship from Axcan Pharma Inc. P.S.H. is a National Research Scientist of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We thank Manlio Bolla of the NicOx company for valuable comments.

REFERENCES

1. **Angulo P.** Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 4: 37-44, 2002.
2. **Browning JD, Horton JD.** Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114: 147-152, 2004.
3. **Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR.** Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474, 1999.
4. **Brunt EM, Tiniakos DG.** Pathological features of NASH. *Front Biosci* 10: 1475-1484, 2005.
5. **Buko VU, Lukivskaya OY, Zavodnik LV, Sadovnichy VV, Petushok NE, Tauschel ND.** Antioxidative effect of ursodeoxycholic acid in the liver of rats with oxidative stress caused by gamma-irradiation. *Ukr Biokhim Zh* 74: 88-92, 2002.
6. **Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW.** Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 37: 544-550, 2003.
7. **Chen SW, Chen YX, Shi J, Lin Y, Xie WF.** The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 51: 2225-2234, 2006.
8. **Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J.** NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35: 373-379, 2002.
9. **Crespo J, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Cayon A, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F.** Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis? *Obes Surg* 11: 254-257, 2001.
10. **Day CP, James OF.** Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 842-845, 1998.
11. **Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ, Bihl F, Cerny A, Cereda JM, Zala JF, Helbling B, Steuerwald M, Zimmermann A.** Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1537-1543, 2006.
12. **Fan JG, Zhong L, Tia LY, Xu ZJ, Li MS, Wang GL.** Effects of ursodeoxycholic acid and/or low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 11: 2346-2350, 2005.
13. **Farrell GC, Larter CZ.** Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43: S99-S112, 2006.

14. **Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A.** NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 39: 932-939, 2003.
15. **Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Mencarelli A, Farneti S, Del Soldato P, Morelli A.** Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. *Br J Pharmacol* 143: 33-42, 2004.
16. **Fiorucci S, Antonelli E, Morelli A.** Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. *Dig Liver Dis* 35 Suppl 2: S61-69, 2003.
17. **Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A.** NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8897-8902, 2001.
18. **Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Del Soldato P, Morelli A, Ignarro LJ.** An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2652-2657, 2001.
19. **Georgescu EF, Georgescu M.** Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. *J Gastrointestin Liver Dis* 16: 39-46, 2007.
20. **Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A.** Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 1667-1672, 2001.
21. **Hettihawa LM PS, Jayasinha SS, Gunasekara SW, Weerarathna TP.** Comparison of insulin resistance by indirect methods - HOMA, QUICKI, and McAuley - with fasting insulin in patients with type 2 diabetes in Galle, Sri Lanka: A pilot study. *Online J Health Allied Scs* 5: 2, 2006.
22. **Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J.** Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 40: 46-54, 2004.
23. **Johnson D LH.** Isolation of liver and kidney mitochondria, In methods in enzymology. *NY Acad Press* 10: 94-96, 1967.
24. **Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, Igura T, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N.** Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol* 47: 556-564, 2007.

25. **Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H.** Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 54: 117-121, 2005.
26. **Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ.** Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41: 1313-1321, 2005.
27. **Kumar D, Tandon RK.** Use of ursodeoxycholic acid in liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 3-14, 2001.
28. **Larter CZ, Farrell GC.** Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat? *J Hepatol* 44: 253-261, 2006.
29. **Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, Rakela J, McGill DB.** Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* 23: 1464-1467, 1996.
30. **Lavine JE.** Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study. *J Pediatr* 136: 734-738, 2000.
31. **Lee RG.** Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler. *Hepatology* 21: 1742-1743, 1995.
32. **Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM.** Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 123: 1304-1310, 2002.
33. **Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79: 502-509, 2004.
34. **Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P.** Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 39: 770-778, 2004.
35. **Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A.** Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Dig Dis Sci* 45: 1921-1928, 2000.
36. **Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ.** A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 39: 940-946, 2003.
37. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
38. **Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ.** Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-438, 1980.

39. **Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N.** Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50: 1844-1850, 2001.
40. **Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N.** Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107: 450-455, 1999.
41. **Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M.** Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37: 917-923, 2003.
42. **Mofrad PS, Sanyal AJ.** Nonalcoholic fatty liver disease. *MedGenMed* 5: 14, 2003.
43. **Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH.** Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 37: 1202-1219, 2003.
44. **Noguchi H, Tazawa Y, Nishinomiya F, Takada G.** The relationship between serum transaminase activities and fatty liver in children with simple obesity. *Acta Paediatr Jpn* 37: 621-625, 1995.
45. **Nonomura A, Enomoto Y, Takeda M, Tamura T, Kasai T, Yoshikawa T, Nakamine H, Kojima H, Uemura M, Zen Y, Minato H.** Clinical and pathological features of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 33: 116-121, 2005.
46. **Oliveira CP, Gayotto LC, Tatai C, Della Nina BI, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Carrilho FJ.** Vitamin C and vitamin E in prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats. *Nutr J* 2: 9, 2003.
47. **Oliveira PJ, Rolo AP, Palmeira CM, Moreno AJ.** Carvedilol reduces mitochondrial damage induced by hypoxanthine/xanthine oxidase: relevance to hypoxia/reoxygenation injury. *Cardiovasc Toxicol* 1: 205-213, 2001.
48. **Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Egawa I, Sawa T, Hazama H, Ohba K, Isomoto H, Mizuta Y, Hayashida K, Murase K, Kadota T, Murata I, Kohno S.** Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 1098-1105, 2002.
49. **Ouazzani-Chahdi A, Elimadi A, Chabli A, Spenard J, Colin P, Haddad PS.** Combining ursodeoxycholic acid or its NO-releasing derivative NCX-1000 with lipophilic antioxidants better protects mouse hepatocytes against amiodarone toxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 233-242, 2007.
50. **Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ.** Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 20: 39-47, 2006.

51. **Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M.** Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35: 367-372, 2002.
52. **Park HS, Park JY, Yu R.** Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 69: 29-35, 2005.
53. **Robertson G, Leclercq I, Farrell GC.** Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1135-1139, 2001.
54. **Sanyal AJ.** Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction? *Am J Gastroenterol* 96: 274-276, 2001.
55. **Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN.** Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183-1192, 2001.
56. **Shiota G, Tuchiya H.** [Mouse NASH model using retinoic acid receptor alpha]. *Nippon Rinsho* 64: 1049-1055, 2006.
57. **Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N.** N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 13: 5127-5132, 2007.
58. **Trauner M, Graziadei IW.** Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 979-996, 1999.
59. **Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, Trevisani F, Guerrieri F, Bernardi M, Altomare E.** Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33: 808-815, 2001.

TABLES

Table I. *Effect of treatments on body and liver weight*

Parameters	BW (g)	WG (g)	LW (g)	LI (%)
Control	563±19	475±8	14.4±0.5	2.5±0.1
NASH	523±17	464±15	16.2±0.7	3.1±0.1*
UDCA	505±15	436±15	13.4±0.6†	2.7±0.1†
N30	537±26	461±25	14.0±0.9†	2.6±0.1†
N15	554±16	478±17	14.6±0.7	2.6±0.1†
N15+VitE	547±12	469±14	15.0±0.7	2.7±0.1†

Measurements were obtained from rats on the day of sacrifice, after 12 weeks of standard diet (Control) or high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX 1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Body weight (BW), weight gain (WG), liver weight (LW), and liver index (LI=LW/BW×100). Values are expressed as means ± SE of 6 to 10 rats. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Table II. *Effect of treatments on biochemical and lipid parameters*

Parameter	AST	ALT	TC	HDL	LDL	TG	LDH
	U/L	U/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	U/L
Control	53.5±4.9	30.2±3.6	0.75±0.07	0.37±0.03	0.09±0.04	0.72±0.02	62±5
NASH	67.8±9.5	39.8±5.6	0.82±0.02	0.35±0.05	0.25±0.03*	0.31±0.04*	111±13*
UDCA	59.2±2.5	34.2±2.4	0.54±0.03†	0.27±0.01	0.17±0.02	0.29±0.03*	68±4†
N30	54.2±5.8	31.7±4.5	0.75±0.06	0.38±0.03	0.21±0.03	0.35±0.03*	68±8†
N15	57.9±5.7	36.5±4.9	0.64±0.05	0.32±0.03	0.14±0.02†	0.31±0.02*	77±12†
N15+VitE	51.7±3.9	29.1±2.7	0.70±0.06	0.29±0.03	0.23±0.04	0.36±0.03*	80±13
ANOVA	0.448	0.461	0.033	0.053	0.012	<0.0001	0.077

Measurements were obtained from plasma of rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control) or high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX 1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; TC, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein cholesterol; LDL, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; LDH, lactate dehydrogenase. Values are expressed as means ± SE of 6 to 10 rats. The P values for the ANOVA Fisher's PLSD test are given. For pairwise comparisons * $P < 0.05$ versus control group and † $P < 0.05$ versus NASH group.

Table III. *Liver histology scoring for macrovesicular steatosis and inflammatory cells infiltration*

Groups	n	Steatosis				Inflammation			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Control	6	6	0	0	0	6	0	0	0
NASH	6	0	0	2	4	0	0	4	2
UDCA	10	3	3	3	1	3	4	3	0
N30	10	2	5	2	1	3	4	3	0
N15	10	5	2	1	2	3	4	2	1
N15+VitE	10	3	3	2	2	4	3	2	1
Chi square		<i>P</i> < 0.05				<i>P</i> < 0.05			

Histological scoring for steatosis and inflammation from rats fed a standard diet for 12 weeks (Control) or a high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX-1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Macrovesicular steatosis grade 0: absent; grade 1: less than 33 %; grade 2: 33-66 %; grade 3: more than 66 %. Inflammation 0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: severe.

FIGURE LEGENDS

Fig. 7. Effect of treatments on glycemetic homeostasis.

Glycemia (panel A) was measured in whole blood and insulin (panel B) was measured in plasma obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX 1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). HOMA-IR (panel C) is indicative of the insulin resistance state for the animals. Values are expressed as means \pm SE of 6 to 10 rats. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 8. Effect of treatments on liver histology.

Representative HPS staining of rat liver sections. The control (CTL, panel A, 20X) group received 12 weeks of standard liquid diet and showed normal histology. The NASH (NASH, panel B; 20X and NASH-close up, 63X) group received a high-fat liquid diet during 12 weeks and revealed macro-vesicles of fat, hepatocyte ballooning, inflammatory cells infiltration such as monocytes (M) and neutrophils (N), necrosis (Nec), and Mallory bodies (Mallory). 12 weeks of high-fat liquid diet with treatment during the last 6 weeks with either UDCA 17.2 mg/Kg (UDCA; panel C, 20X), NCX 1000 30 or 15 mg/Kg (N30, panel D and N15, panel E, respectively; 20X), or NCX 1000 15 mg/Kg plus vitamin E 100 mg/Kg (N15+VitE, panel F, 20X), displayed less macrovesicular steatosis and inflammation than the NASH group.

Fig. 9. Effect of treatments on inflammatory cytokines and adipokines.

TNF- α (panel A) and adiponectin (panel B) were measured using ELISA kits in plasma and serum respectively, and were obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX 1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Values are expressed as means \pm SE of 6 to 10 rats. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 10. Effect of treatments on oxidative stress.

Hepatic malondialdehyde (MDA) (panel A), $O_2^{\bullet-}$ production (panel B) and GSH concentration (panel C) were measured in fresh or frozen liver tissue obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX-1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX-1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Values are expressed as means \pm SE of 6 to 10 rats. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 11. Effect of treatments on mitochondrial ATP

ATP was measured in freshly isolated mitochondria obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX 1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Values are expressed as means \pm SE of 6 to 10 rats. Overall ANOVA was not significant among all groups. Nonetheless, single t-test revealed significance for NASH versus control group * $P < 0.05$.

Fig. 12. Effect of treatments on CYP2E1 and PPAR- α

Representative western blots were performed on liver microsomal fraction for CYP2E1 (panel A) or whole liver homogenates for PPAR- α (panel B) to reveal their protein expression. Livers were obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (CTL), high-fat diet alone (NASH), or with treatment for the last 6 weeks with UDCA (17.2 mg/Kg), NCX-1000 (30 or 15 mg/Kg) (N30, N15 respectively), or NCX 1000 plus vitamin E (15 mg/Kg and 100 mg/Kg, respectively) (N15+VitE). Values are expressed as means \pm SE of 4 samples. * $P < 0.05$ versus control group.

FIGURES

Fig. 7.

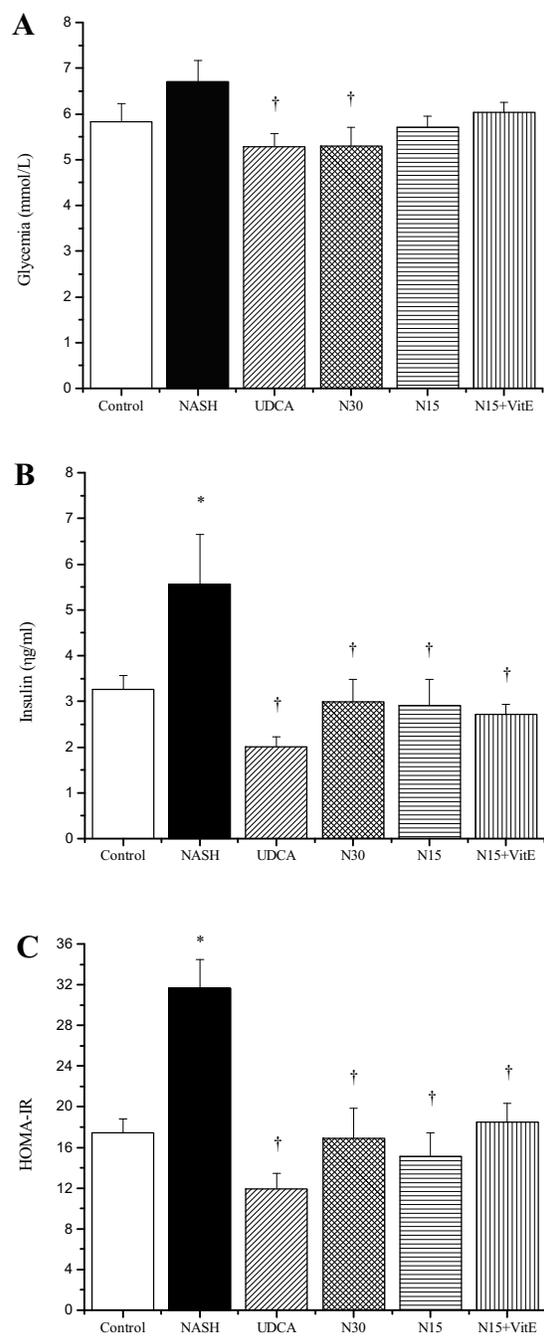


Fig. 8.

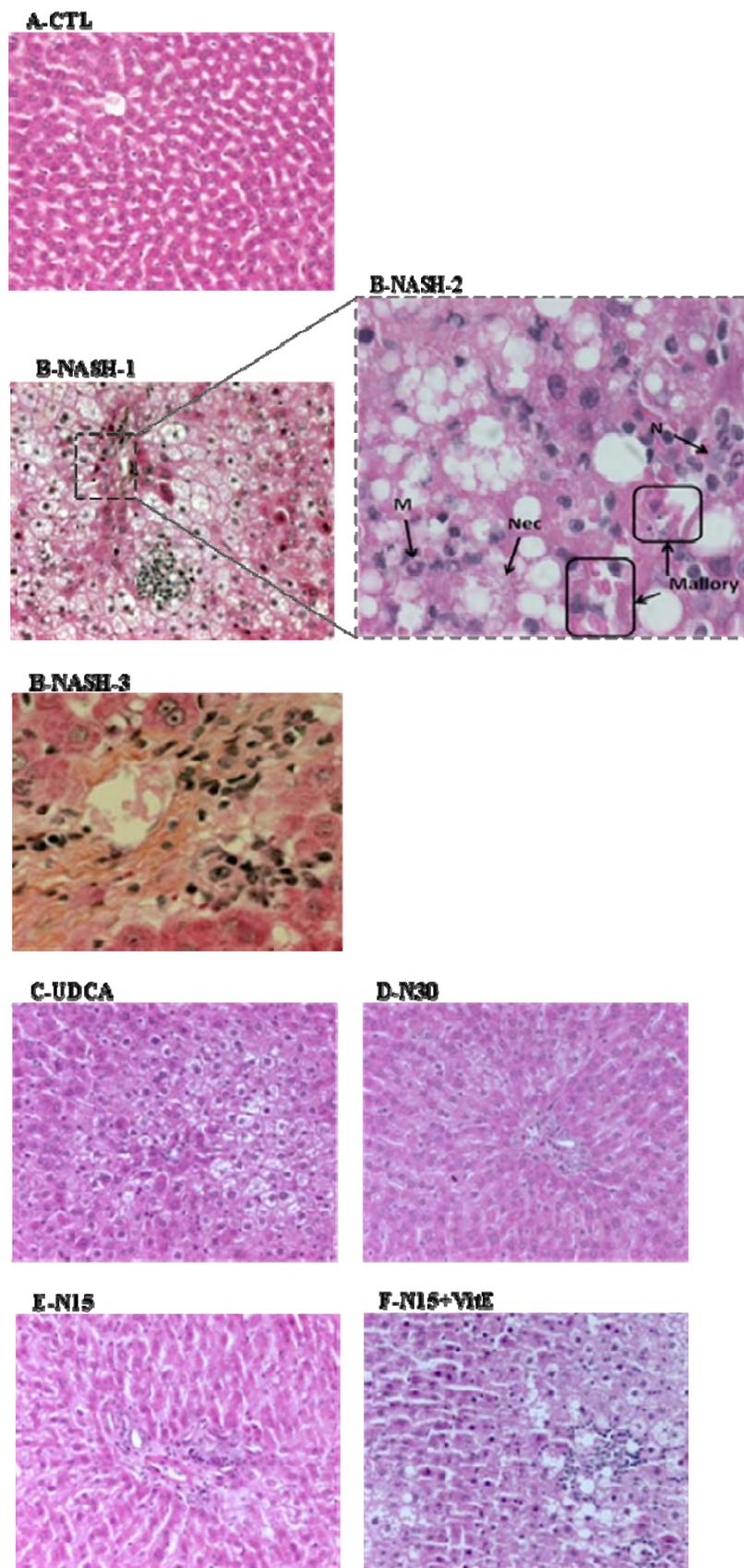


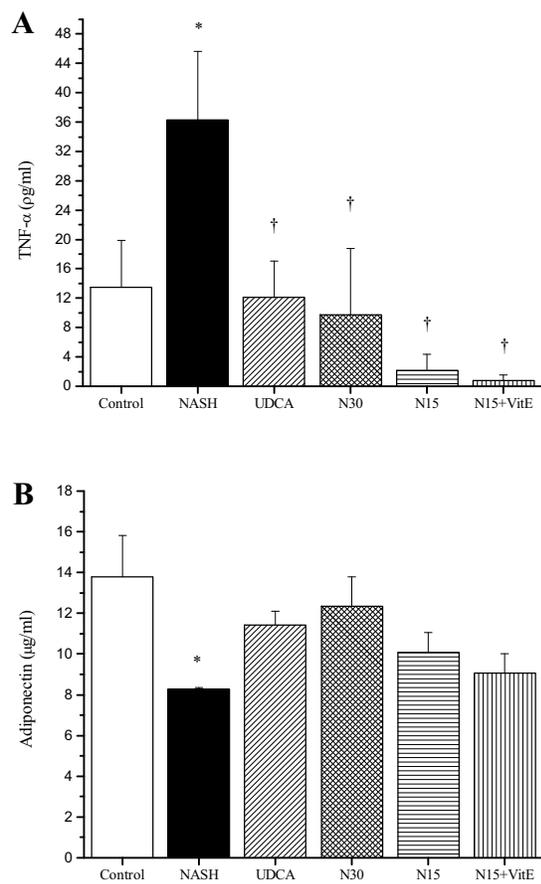
Fig. 9.

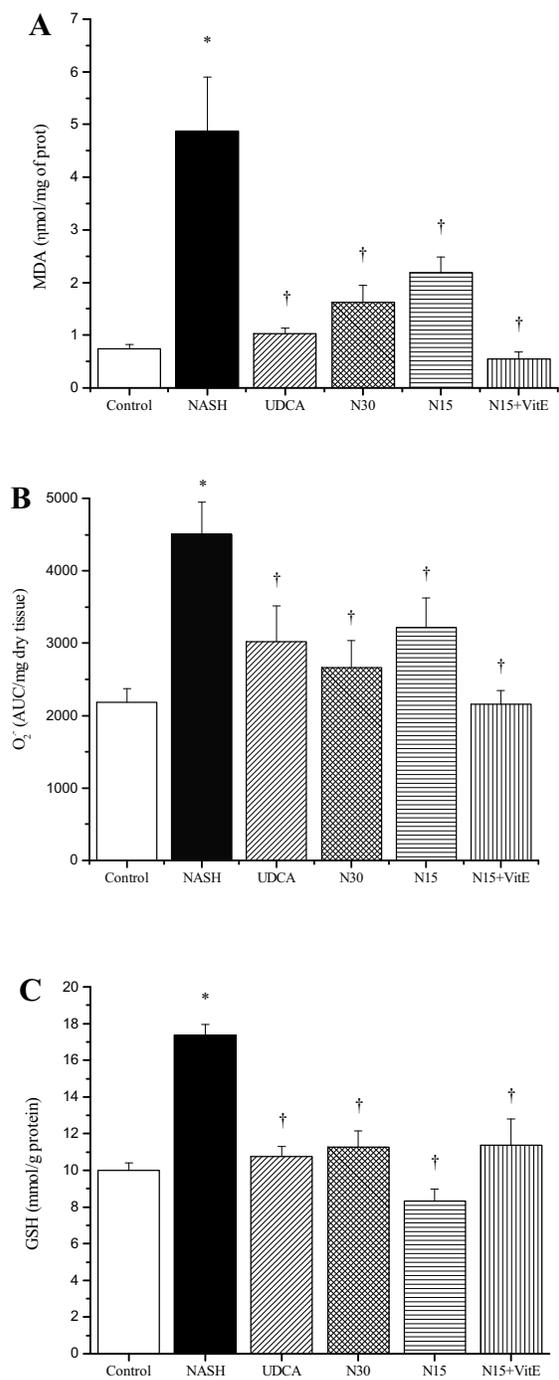
Fig. 10.

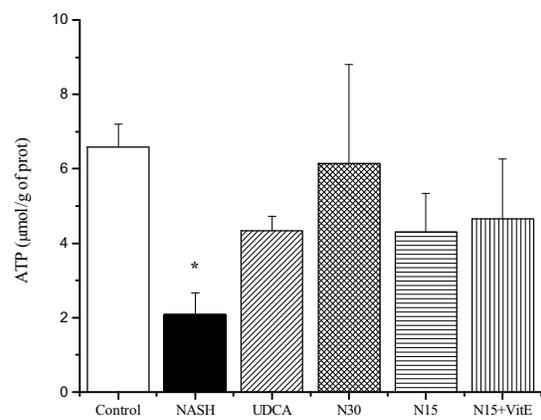
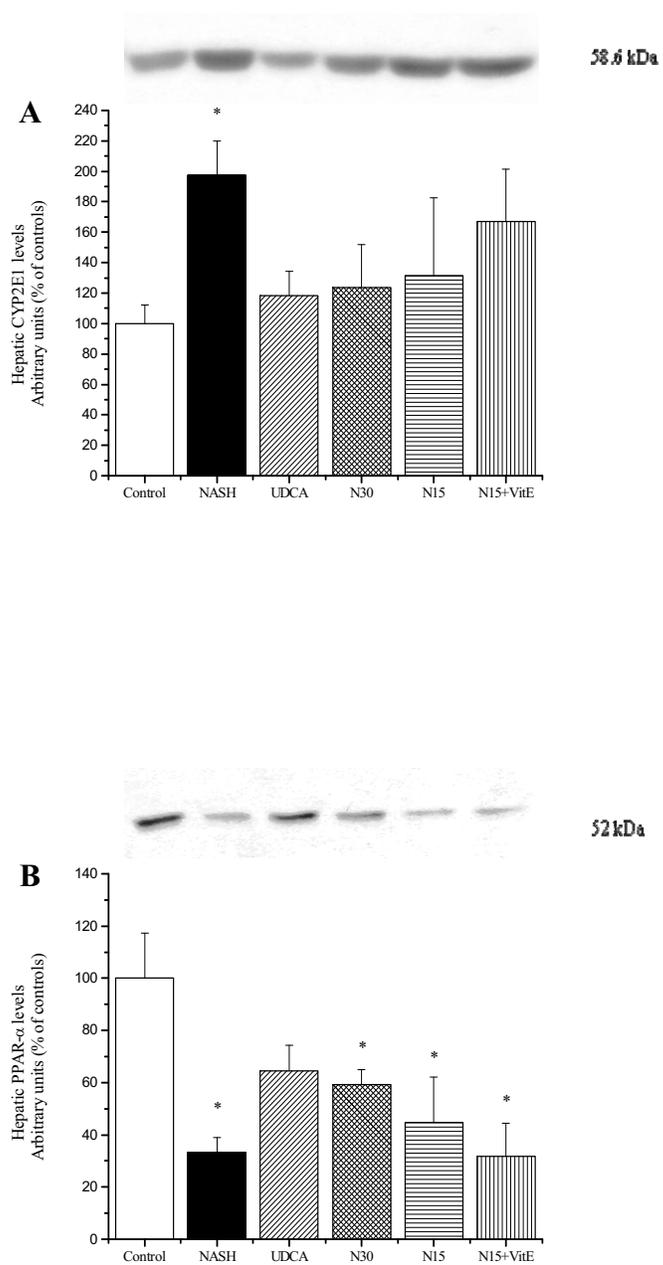
Fig. 11.

Fig. 12.



CHAPITRE III: LE SECOND MANUSCRIT

ANTIOXIDANT AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF SILIBININ IN A RAT MODEL OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Yara Haddad, Diane Vallerand, Antoine Brault, and Pierre S. Haddad

Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

Keywords: NASH, milk thistle, oxidative stress, insulin resistance, high-fat diet.

List of abbreviations:

NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; ROS, reactive oxygen species; HPS, hematoxylin phloxine saffron; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; LDL; low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; MDA, malondialdehyde; O₂⁻, superoxide anion; BW, body weight; LW, liver weight; WG, weight gain; LI, liver index; FFAs, free fatty acids.

ABSTRACT

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a progressive liver disease related to the metabolic syndrome, obesity, and diabetes. The rising prevalence of NASH and the lack of efficient treatments, have led to the exploration of different therapeutical approaches. Milk thistle (*Silibum marianum*) is a medicinal plant used for its hepatoprotective properties in chronic liver disease since the 4th century B.C. We explored the therapeutic effect of silibinin, the plant's most biologically active extract, on experimental NASH rat model. A control (Control) group was fed a standard liquid diet for 12 weeks. The other groups were fed a high-fat liquid diet for 12 weeks without (NASH) or with simultaneous daily supplement with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin 200 mg/kg) for the last 5 weeks. NASH rats developed all key hallmarks of the pathology. Treatment with silibinin improved liver steatosis and inflammation and decreased NASH-induced lipid peroxidation, plasma insulin, and TNF- α . Silibinin also decreased O₂⁻ release and returned LW/BW as well as GSH back to normal. **Conclusion:** Our results suggest that milk thistle's extract, silibinin, possesses antioxidant, hypoinsulinemic, and hepatoprotective properties that act against NASH induced liver damage. This medicinal herb thus shows promising therapeutic potential for the treatment of NASH.

INTRODUCTION

In industrialized countries, a sedentary lifestyle and visceral adiposity are the main factors underlying the development of steatosis, a benign accumulation of hepatic lipids and part of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) spectrum. However, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which is the most serious form of NAFLD, is more likely to evolve towards fibrosis and cirrhosis. Its prevalence has exhibited a sharp rise reaching approximately 3% of the general population (1). The progression from steatosis to NASH is a numerous-hit process that is usually achieved with the participation of dominant phenomena such as insulin resistance, oxidative stress, and inflammation (2, 3). Although the exact pathogenesis of NASH has yet to be understood, several studies focus on strongly related markers such as lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial dysfunction, secretion of inflammatory cytokines and adipokines, infiltration of polymorphonuclear leukocytes, hepatocyte ballooning, formation of Mallory bodies, and collagen deposition to confirm the diagnosis of NASH or to develop new treatments strategies (3-6). Among these strategies, the use of natural antioxidants and hepatoprotective compounds has been gaining popularity in the last decade.

Milk thistle (*Silibum marianum*) is the most ancient and extensively used medicinal plant for its beneficial effects on liver and other organs (7). It was primarily recognized for its capacity to enhance bile flow and to remove obstructions from liver and spleen (7, 8). Silymarin, a flavolignan extracted from the fruits and seeds of the plant, was found effective for protecting against cirrhosis, jaundice and hepatitis (8). Furthermore, *in vitro*, *in vivo* and clinical studies have demonstrated the antioxidant and hepatoprotective effects of silymarin and its major active constituent silibinin (silybin), a polyphenolic molecule, in animal and human models of alcoholic or nonalcoholic chronic liver diseases (9-14). *Silybum marianum* is typically administered as an encapsulated standardized extract (70-80% silymarin) that is poorly absorbed. However, studies carried out in rats and humans have proved a superior bioavailability of silibinin when complexed with phosphatidylcholine (Siliphos®, silipide) (15-18). Indeed, the hepatoprotective and antifibrotic effects of a silibinin-vitamin E-phospholipids complex in a rat model of

chronic liver disease were demonstrated by Di Sario and colleagues (19). Finally, a recent pilot study has also illustrated the effectiveness of that complex in reducing insulin resistance and plasma markers of liver fibrosis in patients with NAFLD (20). However, no trials of silibinin, alone or as a complex, have ever been reported in the context of NASH. Thus, the present study was conducted with the objective of evaluating the efficacy of the silibinin-phosphatidylcholine complex, in protecting the liver against diet-induced NASH in rats.

MATERIALS AND METHODS:

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, USA). Silibinin was obtained from commercially available complex with phosphatidylcholine.

Animals and experimental procedure

Twenty Sprague-Dawley male rats (75-100g) were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Quebec). They had a 5 days adaptation period, in which they had free access to normal rat chow diet and water before the beginning of experimental protocols. Rats were then randomly double-housed and divided into 3 groups. The control group (Control) was comprised of 6 rats that were fed with the Lieber-DeCarli standard liquid diet for 12 weeks. The NASH group, also comprised of 6 rats, received the Lieber-DeCarli high-fat liquid diet for 12 weeks. The treatment group (Silibinin) was composed of 8 rats and was fed with the same high-fat diet for 12 weeks to which was added a complex of silibinin-phosphatidylcholine at a dose of 200 mg/kg (as silibinin) daily, during the last 5 weeks. Diets were acquired from Dyets Inc. (Bethlehem, PA) and mixtures were freshly prepared daily. The respective energetic balances of each diet are listed in Lieber et al 2004 (21). Animals were fed *ad libitum* and kept in a room with controlled temperature and humidity, under a 12:12-hr light-dark cycle. They were monitored weekly for weight and food consumption. All experimental protocols were approved by the University's Ethics Committee and accomplished in accordance to the guidelines of the Canadian Council on the Care of Animals.

Liver isolation

Surgical procedure was performed after overnight fasting. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection with sodium pentobarbital (50 mg/kg b.w.). Rats underwent laparotomy and the portal vein was cannulated. Blood was collected via the inferior vena cava and stored as plasma and serum. Glycemia was directly evaluated using a commercial glucometer (One Touch Ultra, LifeScan, Johnson & Johnson, Milpitas, CA). Livers were flushed for 3 minutes with Krebs-Henseleit buffer (NaCl 145 mM, KCl 4.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 2.1

mM, pH 7.4, 22°C) then removed and weighed. Liver dissection was subsequently performed. Sections from the median lobe were placed in a 10% formalin solution for histopathological analysis and other samples were immediately frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until use.

Histology

Hematoxylin phloxine saffron (HPS) staining was performed on histological sections by the Department of Histology of St-Justine's Children Hospital (Montreal, Qc, Canada). Scoring for steatosis was based on the percentage of hepatocytes containing macrovesicular fat in each section (grade 0: absent; grade 1: less than 33%; grade 2: 33-66%; grade 3: more than 66%), according to published criteria (22, 23). The degree of inflammation was based on the number of immune cells encountered in 10 randomly selected areas (at 400X) within each section using the following scale (0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: severe) (22). Mallory bodies and collagen deposition were evaluated as present or absent. Photos were taken using Axio-imager electronic microscope and Axio-vision 4.2 software (z1 Zeiss, Jena, Germany).

Blood parameters

Plasma lipids, namely triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL), as well as transaminases (ALT and AST) and the lactate dehydrogenase (LDH) were measured by the Department of Biochemistry of St-Justine's Children Hospital (Montreal, Qc, Canada). Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) was assessed using Quantikine Rat TNF- α Immunoassay kit (R&D Systems, MN, USA). Serum adiponectin was measured with a Rat Adiponectin ELISA Kit (AdipoGen, Seoul, Korea). Plasma insulin was evaluated using a Rat Insulin Radioimmunoassay (RIA) kit (Linco Research, St. Charles, MO). The HOMA index was calculated using circulating insulin and glucose values with the following formula: (Fasting insulin (mU/L) x fasting blood glucose (mmol/L) / 22.5) (24).

Isolation of mitochondria

1 g of fresh liver was used for the isolation of mitochondria, as described by Johnson and Lardy (25). Briefly, an ice-cold Teflon potter was used to homogenize tissue in the isolation medium containing sucrose (250 mM), Tris-base (10 mM), EGTA (1 mM), pH 7.2 at 4°C. The homogenate was then centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C, in order to remove cellular fragments. The supernatant was collected and centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was subsequently washed delicately with the same medium, centrifuged, and washed another time with the isolation medium without EGTA and centrifuged one last time. The final pellet, which contained the viable mitochondria, was suspended in this last medium and stored on ice. Protein content was determined following the Lowry method (26).

Assessment of oxidative stress parameters

The thiobarbituric acid (TBA) method was used to evaluate liver lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) levels. Briefly, fresh liver (0.5 g) was homogenized on ice in a sucrose buffer (4.5 ml, 250 mM) using a Teflon potter homogenizer and a polytron. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 30 min at 4°C. The protein content of the supernatant was determined using the Bradford method. The supernatant (200 µl) was added to a vial containing an 8.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate solution (200 µl), a 20% (v/v) acetic acid solution (pH 3.5) (1.5 ml), a 0.8% (w/v) TBA solution (1.5 ml) and distilled water (600 µl). Vials were heated at 95°C for 45 min and cooled on ice for 2 min. Butanol (4 ml) was added and all vials were mixed for 15 min and then centrifuged at 1000 g for 10 min. Finally, 200 µl of supernatants were transferred into a 96 well plate and TBARS were estimated by measuring fluorescence ($\lambda_{\text{ex}}=530$ nm; $\lambda_{\text{em}}=590$ nm) using a multilabel counter model Wallac Victor² (Perkin Elmer, Woodbridge, ON). The data were compared to a standard curve of MDA (0 to 84 µM) and results were expressed as nmol MDA/mg of protein.

The superoxide anion: $\text{O}_2^{\cdot-}$ in liver tissue was determined using the Lucigenin-amplified chemiluminescence procedure, as described by Oliveira and colleagues (27). In brief, a frozen liver fragment was incubated for 15 min in an oxygenated

(95% O₂-5% CO₂) Krebs-HEPES buffer containing NaCl (118.3 mM), KCl (4.69 mM), CaCl₂ (1.87 mM), MgSO₄ (1.2 mM), KH₂PO₄ (1.03 mM), NaHCO₃ (25 mM), glucose (11.1 mM) and Na-HEPES (20 mM), pH 7.4, at 37°C. The fragment was transferred into a scintillation vial containing 2 ml of this buffer, supplemented with lucigenin (250 mM). The scintillation counter (Wallac 1409 Model, Perkin Elmer Life Science, St-Laurent, QC) was adjusted for single-photon emission recording mode. The counts appraisal was performed during a 15 min period. Data were obtained from the area under the counts versus time curve and expressed as a function of the dry tissue's weight (mg).

Reduced glutathione: 0.5 g of fresh liver was minced on ice and then homogenized with an ice-cold polytron, in 1 ml of a metaphosphoric acid solution (5%) prepared daily. Homogenate was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was used for assessment of reduced glutathione (GSH) using the Bioxytech GSH-400 Assay Kit (Oxis International Inc, Portland, USA) according to the manufacturer's instructions. Absorbance at 400 nm was evaluated using a Ultrospec[®] 2100 pro spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, England). Data were compared to a standard curve of reduced GSH (0-90 µM).

Mitochondrial ATP

100 µl of freshly isolated mitochondria were added to ice-cold HClO₄ (900 µl, 1M) and centrifuged at 2 000 g for 10 min at 4°C. The supernatant (100 µl) was neutralized with KOH (47 µl, 2M) and Tris-HCl (853 µl, 100 mM). Assessment of bioluminescence was carried out using the ATP Bioluminescent Assay Kit (SIGMA, Oakville, ON) according to the manufacturer's instructions with a multilabeled counter model Wallac Victor² (Perkin Elmer, Woodbridge, ON). The data were then compared to a standard curve of ATP from 0 to 80 µM and results were expressed in µmol ATP/g of protein.

Western blotting

Western blot analysis was performed on total liver homogenate using a rabbit polyclonal anti-PPAR-α primary antibody (1:400) (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) and a goat polyclonal anti-rabbit secondary antibody (1:100 000)

(Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore, PA). Liver microsomal fraction was also subjected to western blot analysis using mouse monoclonal anti-rat P450 CYP2E1 primary antibody (1:1000) (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) and a goat anti-mouse secondary antibody (1:4000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Immunoreactive proteins were detected with an enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, ECL Western Blotting Detection Reagents, Buckinghamshire, UK). Band quantification was performed using ImageJ 1.37v (NIH, USA).

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SE. Group means were compared by one way ANOVA followed by Fisher's PLSD test (and the Chi square test for histological contingency table) using StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc. NC). A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Changes in body and liver weights

As shown in Table IV, there were no significant differences in body weight (BW) or weight gain (WG) between groups. In contrast, the high-fat diet increased the liver weight (LW) in the NASH group as compared to the control group and this resulted in a significant raise in liver index (LI). Moreover, silibinin treatment during the last 5 weeks of the high-fat diet protocol decreased the LW and the LI significantly when compared to the NASH group ($P < 0.05$) to values very similar to those observed in the control group.

Glycemic homeostasis

Similarly to body weight, no statistically significant changes in fasting blood glucose were observed between groups (Fig. 13. panel A). In contrast, 12 weeks of high-fat diet induced hyperinsulinemia in NASH rats as compared to the control group rats (plasma insulin values of 5.22 ± 0.98 and 2.86 ± 0.21 $\eta\text{g/ml}$, respectively; Fig. 13. panel B, $P < 0.05$). This situation was associated with an important increase in insulin resistance, as demonstrated by the significantly higher value of HOMA-IR in NASH animals as compared to control congeners (Fig. 13. panel C; $P < 0.05$). Both plasma insulin and HOMA-IR values were decreased significantly by silibinin treatment as compared to NASH treatment (Fig. 13. panels B and C; $P < 0.05$). Moreover, values in the silibinin group were even lower than those observed in control animals.

Biochemical parameters

As presented in Table V, no significant changes were observed in plasma transaminase (ALT, AST) and total cholesterol (TC) between experimental groups. The 12 week NASH-inducing high-fat diet was associated with significant increases in LDL and plasma LDH whereas TG were reduced as compared to controls. Silibinin treatment was unable to significantly reverse these changes. However, plasma HDL were reduced significantly by the silibinin treatment although they did not increase significantly in the NASH group.

Histological evaluation

Liver biopsy evaluation is presently the gold standard test for the diagnosis of NASH. In the control group, liver sections exhibited normal global histological features (Fig. 14. panel A-CTL and Table VI). Liver sections from rats in the NASH group revealed that more than one third of hepatocytes contained macrovesicles of fat (Fig. 14. panel B-NASH-1), which corresponded to grade 2 or 3 of steatosis (Table VI). In addition, necrotic hepatocytes, Mallory bodies (Fig. 14. panel B-NASH-2), and collagen deposition (Fig. 14. panel B-NASH-3) were exclusively found in samples from the NASH group. A 5-week treatment with silibinin 200 mg/kg promoted significant improvement in histology (Fig. 14. panel C-SIL). Indeed, more than 60 % of rats in the silibinin group had less than a third of hepatocytes containing macrovesicular fat (grade 0 or 1 steatosis), as compared to rats in the NASH group (100 % grade 2 or 3 steatosis). In parallel, the liver infiltration of immune inflammatory cells was very rarely encountered in control animals. In contrast, 80 % of NASH rats revealed inflammatory cell infiltration ranging from moderate to severe (Fig. 14. panel B-NASH-2). Silibinin significantly improved this parameter (Table VI), albeit not back to levels observed in control animals.

Inflammatory cytokines and adipokines

Adipose tissue and macrophages (including liver Kupffer cells), produce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α . During stress, the generation of elevated amounts of TNF- α impairs insulin signalling, leading ultimately to insulin resistance. TNF- α was higher in the plasma of NASH rats than in that of control rats (42.3 ± 8.8 and 15.4 ± 7.1 $\mu\text{g/ml}$, respectively; Fig. 15. panel A, $P < 0.05$). Conversely, silibinin remarkably and significantly diminished TNF- α level ($P < 0.05$). Another adipokine secreted by the adipose tissue is adiponectin. This hormone is known to decrease during fatty liver disease and the metabolic syndrome. The high-fat diet reduced significantly the adiponectin levels in NASH rats as compared to control animals. The silibinin treatment caused a considerable augmentation in circulating adiponectin but statistical significance was not achieved. (Fig. 15. panel B).

Oxidative stress

MDA is a lipid peroxidation product generated during oxidative stress. Fig. 16. panel A shows a more than four-fold increase in hepatic MDA level in the NASH group as compared to the control group (4.29 ± 1.05 versus 0.80 ± 0.09 η mol/mg of protein, respectively; $P < 0.05$). Lipid peroxidation was efficiently counteracted by the treatment with 200 mg/kg of silibinin as compared with the NASH group ($P < 0.05$).

Also during oxidative stress, the liver produces the superoxide anion (O_2^-), an important reactive oxygen species (ROS). As shown in Fig. 16. panel B, hepatic O_2^- level was nearly twice as high in the NASH group as compared to the control group (4473 ± 466 and 2197 ± 190 AUC/mg dry tissue, respectively; $P < 0.05$). Silibinin was able to reduce significantly O_2^- to 2267 ± 267 AUC/mg dry tissue, a value very similar to that of the control group ($P < 0.05$).

Hepatic reduced glutathione (GSH) is a potent antioxidant, also produced by the liver as a mechanism of intracellular defense. As illustrated by Fig. 16. panel C, GSH level was significantly higher in the NASH group than in the control group (16.8 ± 1.2 vs. 9.8 ± 0.4 mmol/g of protein, $P < 0.05$), as a result of the stress induced by a 12-week high-fat diet. The silibinin treatment significantly diminished hepatic glutathione to a value of 9.3 ± 0.4 mmol/g of protein, which is equivalent to that of the control group.

Mitochondrial dysfunction

The high-fat treatment caused a significant decrease in hepatic mitochondrial ATP production, as observed in the NASH group comparatively to the control group (Fig. 17; $P < 0.05$). This cellular energetic imbalance was not corrected with the silibinin treatment.

Expression of CYP2E1 and PPAR- α

Impaired mitochondrial β -oxidation as well as increased peroxisomal β -oxidation and microsomal ω -oxidation of free fatty acids (FFAs) in hepatocytes lead to the overproduction of ketones. The cytochrome P450 CYP2E1 is the metabolizing enzyme upregulated by elevated levels of ketone bodies in the liver. As shown in Fig. 18, panel A, the high-fat diet caused an increase in the microsomal expression

of cytochrome P450 CYP2E1 in livers from the NASH rats (84 % above control, $P < 0.05$). CYP2E1 expression was unchanged in the silibinin group as compared to the NASH group.

The transcription factor responsible for the activation of fat metabolism genes is the peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α). Its expression was decreased in livers of NASH animals as compared to values observed in the control group (34 % of control, $P < 0.05$), Silibinin treatment failed to return the expression of PPAR- α to control levels (Fig. 18. panel B).

DISCUSSION

NASH is a severe subset of NAFLD that may evolve to cirrhosis and liver failure. Its prevalence is increasing in global populations due to the rising incidence of its closely related conditions, namely visceral adiposity, the metabolic syndrome, and diabetes mellitus (2). At present, no pharmacological treatment has been convincingly efficient against NASH. In fact, slight but consistent weight loss, healthy eating regimen, and exercise together with a number of therapeutic avenues, remain the center of all strategies to improve or reverse the main NASH-induced injuries (28, 29). Among attractive novel therapeutic possibilities, milk thistle and its major active compounds have caught our interest because of their various properties known, for centuries, to be beneficial in liver disease.

The standardized extract of milk thistle that has been most widely researched is silymarin, of which silibinin (or silybin) is the major active component. Silibinin's hepatoprotective properties have been reported in several *in vitro* (30) and *in vivo* (31, 32) studies. Moreover, silibinin was shown to be anti-fibrogenic in the liver by reducing activation and proliferation of isolated and cultured stellate cells (33) and by decreasing collagen accumulation in experimental liver fibrosis (34, 35) in rats. Furthermore, silibinin protected liver cells from mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by iron overload, as reported by Pietrangelo and colleagues in 2002 (36). Finally, silibinin was described as an antioxidant in several studies because of its capacity to decrease lipid peroxidation, to reduce the release of $O_2^{\cdot-}$, and to restore hepatic GSH level (37, 38). These effects were also demonstrated in our previous study in which silibinin afforded mitochondrial and antioxidant protection against liver injuries induced by cold preservation/warm reperfusion in rats (39). Considering that all the aforementioned features contribute to the pathogenesis of NASH, we therefore evaluated the beneficial effects of silibinin in an experimental *in vivo* rat model of NASH.

To induce the pathology, we selected a dietary model developed by Lieber and colleagues in 2004 (21) that reproduces the dominant clinical features of NASH in rats, following the consumption of a high-fat liquid diet. This method appropriately mimics the human condition given that NASH is intimately associated with a fat-rich sedentary life-style in obese and non-obese patients (6). Our results clearly

demonstrate that the ingestion of the Lieber liquid high-fat diet during 12 weeks produces all the prominent characteristics of NASH. Firstly, we observed a marked accumulation of fat and an important infiltration of immune cells (leukocytes and polymorphonuclear neutrophils) as a result of a histological evaluation. In addition, the presence of hepatocyte ballooning, collagen deposition, and Mallory bodies were also detected and represent typical features of NASH previously reported in several studies (2, 5, 40-42). Physiologically, we did not find any change in the body weight of NASH animals, as also seen in the clinical setting and possibly due to the fact that NASH is more correlated with visceral adiposity than general obesity (6, 43). This is consistent with observations that despite the fact that obesity is a major risk factor for NASH, not all patients are obese (44). Similarly, liver transaminase levels were unaltered, as formerly reported by some clinical studies (2, 45, 46). Hyperinsulinemia and an elevated HOMA-IR index observed in our NASH animals confirmed the presence of insulin resistance. In fact, aside from representing a reliable predictor for NAFLD (47-50), insulin resistance is also recognized as a major promoter of steatosis (51, 52). Furthermore, our NASH rats exhibited several indicators of oxidative stress. Indeed, lipid peroxidation (MDA production), ROS production (superoxide anion), antioxidant defense (GSH), and microsomal expression of CYP 2E1 (major catalyst of oxidative stress (53, 54)) were all increased in the liver of NASH animals. Moreover, the decreased ATP production in our model is indicative of mitochondrial dysfunction (55). At last, elevated plasma TNF- α and low serum adiponectin levels confirm the existence of the inflammation reported previously in NASH (56, 57). These adipokines are also associated with insulin resistance (58). Thus, the human pathology was successfully reproduced by the Lieber high-fat rat model of NASH. Furthermore, it is important to note that the principal histological features of NASH, including steatosis, inflammation, and fibrosis, were already present after six weeks of the Lieber diet. Therefore, rats received the silibinin therapy during the last 5 weeks of the experiment with the objective of treating the disease.

Treatment with 200 mg/kg of silibinin (added to the diet as a silibinin-phosphatidylcholine complex) during five weeks, along with the uninterrupted intake of the high-fat diet, was very efficient at reversing the progression of NASH.

Indeed, the histological grade of steatosis was significantly improved by silibinin treatment and this was accompanied by a normalization of liver weight and liver index as well as plasma lipid levels (notably HDL and LDL). Despite this, silibinin treatment failed to restore impaired PPAR- α expression or to reduce the elevated expression of CYP 2E1. A reducing effect on CYP 2E1 was previously reported in human hepatocytes but required very high doses of the milk thistle component (59). On the other hand, insulin sensitivity was restored by silibinin treatment as suggested by regularized insulinemia and HOMA-IR, despite the continued intake of the NASH-inducing high-fat diet. This hypoinsulinemic effect was shown in a previous clinical trial on cirrhotic diabetic patients (13). There was also a tendency for silibinin to reverse the NASH-induced reduction of circulating adiponectin and mitochondrial ATP levels, consistent with the reversal of insulin resistance, albeit failing to reach statistical significance. Such an insulin sensitizing effect was previously observed in patients with chronic liver damage that were treated with a silibinin-vitamin E-phospholipids complex (20). Part of this effect was attributed to the antioxidant properties of silibinin (13). Indeed, the latter were evident from the return to normal of all parameters of hepatic oxidative stress (lipid peroxidation, ROS generation, reduced glutathione).

Likewise, the hepatoprotective effect of silibinin was confirmed by the normalized level of circulating LDH. In addition, silibinin treatment significantly improved all indicators of inflammation that were heightened by the induction of NASH. Indeed, the infiltration of immune cells into liver tissue was significantly diminished and circulating TNF- α level was remarkably reduced. Moreover, the livers of silibinin treated rats were devoid of necrosis, Mallory bodies, and fibrosis. Such hepatoprotective, antioxidant and anti-fibrogenic effects of silibinin are consistent with previous studies (31, 32, 34, 35, 37, 38, 60). Overall, our study confirms that a natural hepatoprotectant such as silibinin is efficient at improving injuries caused by a chronic liver disease. It also demonstrates for the first time that a therapeutic treatment with silibinin, administered as a complex with phosphatidylcholine, is effective in reducing steatosis, inflammation, oxidative stress and insulin resistance in an *in vivo* rat model of diet-induced NASH. Finally, the results of our study

support a further evaluation of silibinin as a therapy for NASH in future clinical studies.

References

1. Angulo P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:37-44.
2. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152.
3. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
4. Agrawal RP, Sharma A, Dua AS, Chandershekhar, Kochar DK, Kothari RP. A randomized placebo controlled trial of Inolter (herbal product) in the treatment of type 2 diabetes. *J Assoc Physicians India* 2002;50:391-393.
5. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathological features of NASH. *Front Biosci* 2005;10:1475-1484.
6. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
7. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1. *Altern Med Rev* 1998;3:410-421.
8. Comar KM, Kirby DF. Herbal remedies in gastroenterology. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:457-468.
9. Feher J, Lang I, Nekam K, Muzes G, Deak G. Effect of free radical scavengers on superoxide dismutase (SOD) enzyme in patients with alcoholic cirrhosis. *Acta Med Hung* 1988;45:265-276.
10. Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2005;149:29-41.
11. Lucena MI, Andrade RJ, de la Cruz JP, Rodriguez-Mendizabal M, Blanco E, Sanchez de la Cuesta F. Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:2-8.
12. Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol* 2007;560:110-116.
13. Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, Dapas F, Caffau C, Zilli M. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on

hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol* 1997;26:871-879.

14. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* 2001;15:465-489.

15. Barzaghi N, Crema F, Gatti G, Pifferi G, Perucca E. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin- phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1990;15:333-338.

16. Buzzelli G, Moscarella S, Giusti A, Duchini A, Marena C, Lampertico M. A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993;31:456-460.

17. Gallo D, Giacomelli S, Ferlini C, Raspaglio G, Apollonio P, Prislei S, et al. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:2403-2410.

18. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1993;18:289-297.

19. Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, Omenetti A, Candelaresi C, Marzioni M, et al. Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine-Vitamin E complex in rats. *Dig Liver Dis* 2005;37:869-876.

20. Loguercio C, Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, de Sio I, Di Leva A, et al. The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2007;52:2387-2395.

21. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-509.

22. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.

23. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.

24. Hettihawa LM PS, Jayasinha SS, Gunasekara SW, Weeraratna TP. Comparison of insulin resistance by indirect methods - HOMA, QUICKI, and

- MCAuley - with fasting insulin in patients with type 2 diabetes in Galle, Sri Lanka: A pilot study. *Online J Health Allied Scs* 2006;5:2.
25. Johnson D LH. Isolation of liver and kidney mitochondria, In *methods in enzymology*. N.Y. Acad. Press 1967;10:94-96.
 26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
 27. Oliveira PJ, Rolo AP, Palmeira CM, Moreno AJ. Carvedilol reduces mitochondrial damage induced by hypoxanthine/xanthine oxidase: relevance to hypoxia/reoxygenation injury. *Cardiovasc Toxicol* 2001;1:205-213.
 28. Friedman MI, Koch JE, Graczyk-Milbrandt G, Ulrich PM, Osbakken MD. High-fat diet prevents eating response and attenuates liver ATP decline in rats given 2,5-anhydro-D-mannitol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R710-714.
 29. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki S, et al. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 1997;27:103-107.
 30. Sonnenbichler J, Zetl I. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Prog Clin Biol Res* 1986;213:319-331.
 31. Kropacova K, Misurova E, Hakova H. Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage. *Radiats Biol Radioecol* 1998;38:411-415.
 32. Letteron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, et al. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem Pharmacol* 1990;39:2027-2034.
 33. Fuchs EC, Weyhenmeyer R, Weiner OH. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung* 1997;47:1383-1387.
 34. Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 1997;26:643-649.

35. Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001;35:392-398.
36. Pietrangelo A, Montosi G, Garuti C, Contri M, Giovannini F, Ceccarelli D, et al. Iron-induced oxidant stress in nonparenchymal liver cells: mitochondrial derangement and fibrosis in acutely iron-dosed gerbils and its prevention by silybin. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:67-79.
37. de Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 1998;12:249-255.
38. Victorrajmohan C, Pradeep K, Karthikeyan S. Influence of silymarin administration on hepatic glutathione-conjugating enzyme system in rats treated with antitubercular drugs. *Drugs R D* 2005;6:395-400.
39. Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddad Y, Haddad PS. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury. *J Ethnopharmacol* 2008;115:507-514.
40. Crespo J, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Cayon A, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis? *Obes Surg* 2001;11:254-257.
41. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler. *Hepatology* 1995;21:1742-1743.
42. Nonomura A, Enomoto Y, Takeda M, Tamura T, Kasai T, Yoshikawa T, et al. Clinical and pathological features of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005;33:116-121.
43. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;69:29-35.
44. Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, Egawa I, Sawa T, Hazama H, et al. Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1098-1105.
45. Mofrad PS, Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease. *MedGenMed* 2003;5:14.

46. Noguchi H, Tazawa Y, Nishinomiya F, Takada G. The relationship between serum transaminase activities and fatty liver in children with simple obesity. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:621-625.
47. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.
48. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455.
49. Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction? *Am J Gastroenterol* 2001;96:274-276.
50. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.
51. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-379.
52. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-372.
53. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-550.
54. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1135-1139.
55. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33:808-815.
56. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, Fukushima J, Kiso S, Fukui K, et al. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J Hepatol* 2007;47:556-564.

57. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:117-121.
58. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46-54.
59. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clin Biochem* 1999;32:519-536.
60. Kidd P, Head K. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos). *Altern Med Rev* 2005;10:193-203.

Tables

Table IV. *Effect of silibinin on body and liver weight*

Parameters	BW (g)	WG (g)	LW (g)	LI (%)
Control	559±18	468.9±6.2	14.2±0.5	2.5±0.1
NASH	526±15	433.3±17.1	16.7±0.6*	3.2±0.1*
Silibinin	510±12	432.4±11.6	13.4±0.8†	2.6±0.1†

Measurements were obtained from rats on the day of sacrifice, after 12 weeks of standard diet (Control) or high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Body weight (BW), weight gain (WG), liver weight (LW), and liver index (LI=LW/BWx100) are presented. Values are expressed as means ± SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Table V. *Effect of silibinin on biochemical and lipid parameters*

Parameters	AST	ALT	TC	HDL	LDL	TG	LDH
	U/L	U/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	U/L
Control	57±6	28±3	0.79±0.08	0.33±0.02	0.11±0.04	0.65±0.06	66.1±6.2
NASH	64±9	39±6	0.80±0.02	0.36±0.04	0.23±0.03*	0.34±0.05*	104.1±13.4
Silibinin	63±5	31±3	0.62±0.05	0.26±0.01	0.15±0.02	0.35±0.03	86.3±10.0
ANOVA	0.709	0.204	0.097	0.102	0.0551	0.0004	0.0442

Measurements were obtained from plasma of rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control) or high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; TC, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein cholesterol; LDL, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; LDH, lactate dehydrogenase. Values are expressed as means \pm SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. The *P* values for the ANOVA Fisher's PLSD test are given. For pairwise comparisons * *P* < 0.05 versus control group and † *P* < 0.05 versus NASH group.

Table VI. *Effect of silibinin on liver histology scoring for macrovesicular steatosis and inflammatory cells infiltration*

Groups	n	Steatosis				Inflammation			
		0	1	2	3	0	1	2	3
Control	6	5	1	0	0	5	0	1	0
NASH	6	0	0	1	5	0	0	3	3
Silibinin	8	2	1	1	2	2	1	4	1
Chi square		<i>P</i> < 0.05				<i>P</i> < 0.05			

Histological scoring for steatosis and inflammation from rats fed a standard diet for 12 weeks (Control) or a high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Macrovesicular steatosis grade 0: absent; grade 1: less than 33%; grade 2: 33-66%; grade 3: more than 66%. Inflammation 0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: severe. The *P* values for the Chi square test are given and are significant among all groups for both parameters.

Figure legends

Fig. 13. Effect of silibinin on glycemc homeostasis

Glycemia (panel A) was measured in whole blood and insulin (panel B) was measured in plasma obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control) or high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. HOMA-IR (panel C) is indicative of the insulin resistance state for the animals. Values are expressed as means \pm SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 14. Effect of silibinin on liver histology

Representative HPS staining of rat liver sections. The control (**A-CTL**; 20X) group received 12 weeks of standard liquid diet and showed normal histology. The NASH (**B-NASH-1,2, and 3**; 10X, 40X, and 20X, respectively) group received a high-fat liquid diet during 12 weeks and revealed severe steatosis, hepatocyte ballooning, important inflammatory cells infiltration such as monocytes (M) and neutrophils (N), necrosis (Nec), Mallory bodies (Mallory), and fibrosis. Twelve weeks of high-fat liquid diet supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (**C-SIL**; 20X), at a dose of 200 mg/kg as silibinin during the last 5 weeks, displayed mild steatosis and moderate inflammation.

Fig. 15. Effect of silibinin on inflammatory cytokines and adipokines

TNF- α (panel A) and adiponectin (panel B) were measured using ELISA kits in plasma and serum respectively, and were obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Values are expressed as means \pm SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 16. Effect of silibinin on oxidative stress parameters

Hepatic malondialdehyde (MDA) (panel A), $O_2^{\bullet-}$ production (panel B) and GSH concentration (panel C) were measured in fresh or frozen liver tissue obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Values are expressed as means \pm SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. * $P < 0.05$ versus control group. † $P < 0.05$ versus NASH group.

Fig. 17. Effect of silibinin on mitochondrial ATP

ATP was measured in freshly isolated mitochondria obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (Control), high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (Silibinin), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Values are expressed as means \pm SE of 6 rats for Control and NASH groups and of 8 rats for Silibinin group. * $P < 0.05$ versus control group.

Fig. 18. Effect of silibinin on CYP2E1 and PPAR- α

Representative western blots were performed on liver microsomal fraction for CYP2E1 or whole liver homogenates for PPAR- α to reveal their protein expression. Livers were obtained from rats in the fasting state, after 12 weeks of standard diet (CTL), high-fat diet alone (NASH), or supplemented with silibinin-phosphatidylcholine complex (SIL), at a dose of 200 mg/kg as silibinin, during the last 5 weeks. Values are expressed as means \pm SE of 6 to 8 samples for each group. * $P < 0.05$ versus control group.

Figure 13

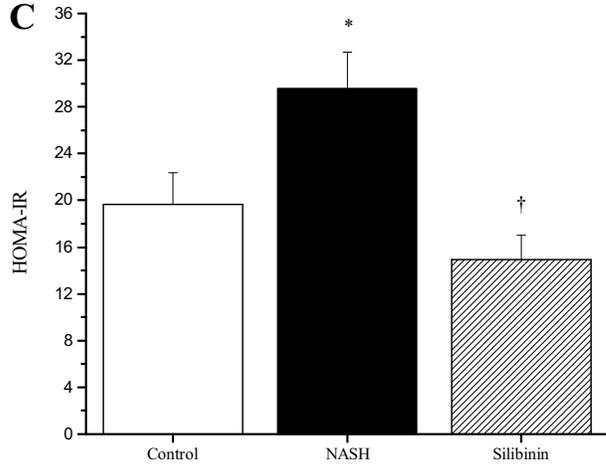
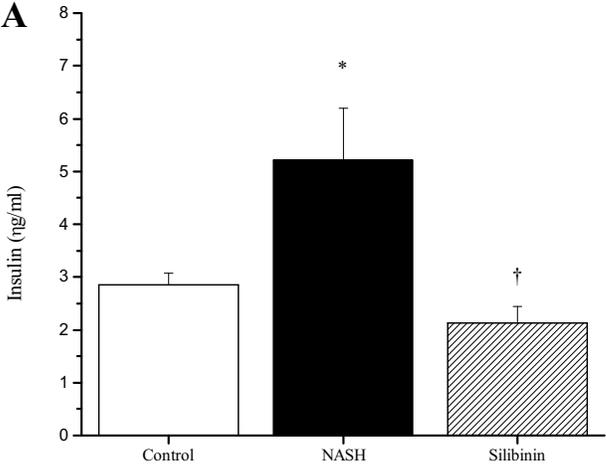
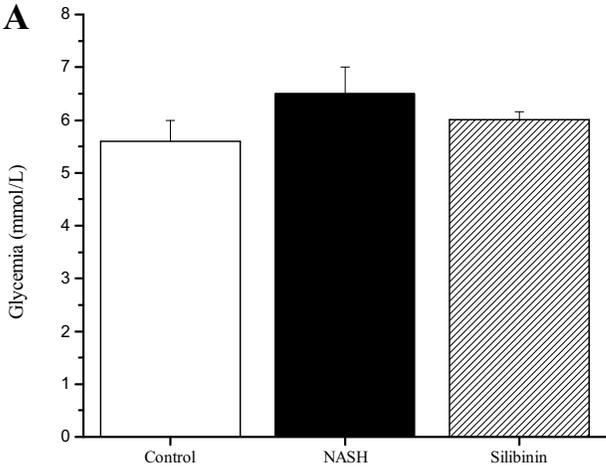


Figure 14

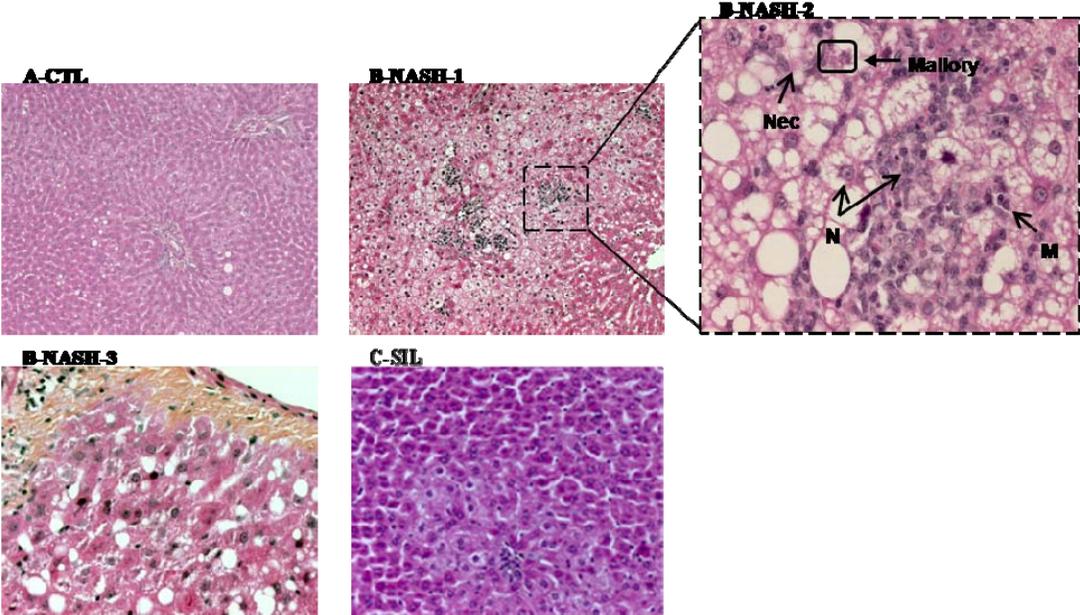


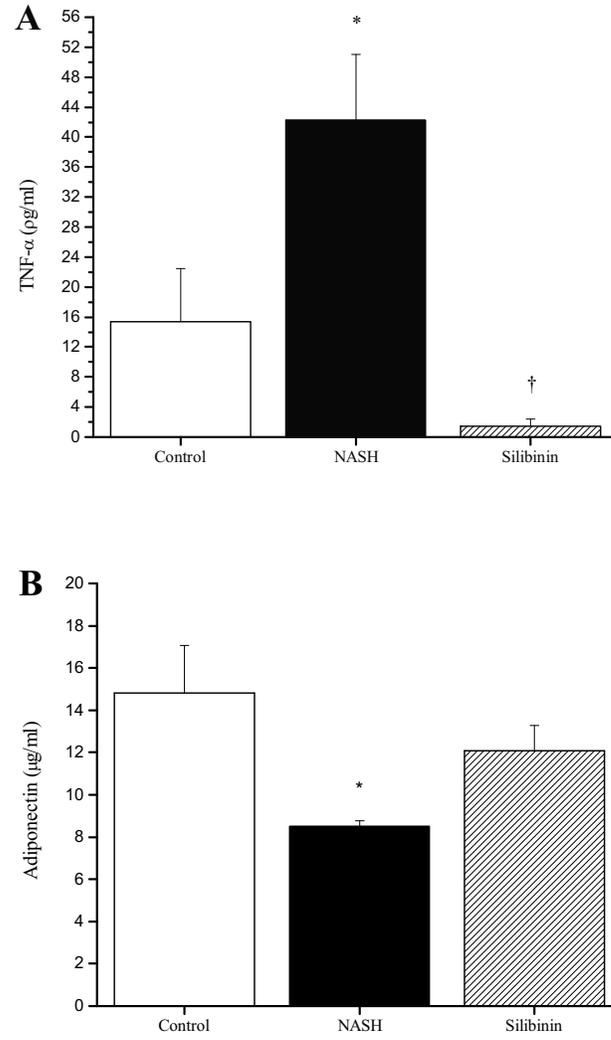
Figure 15

Figure 16

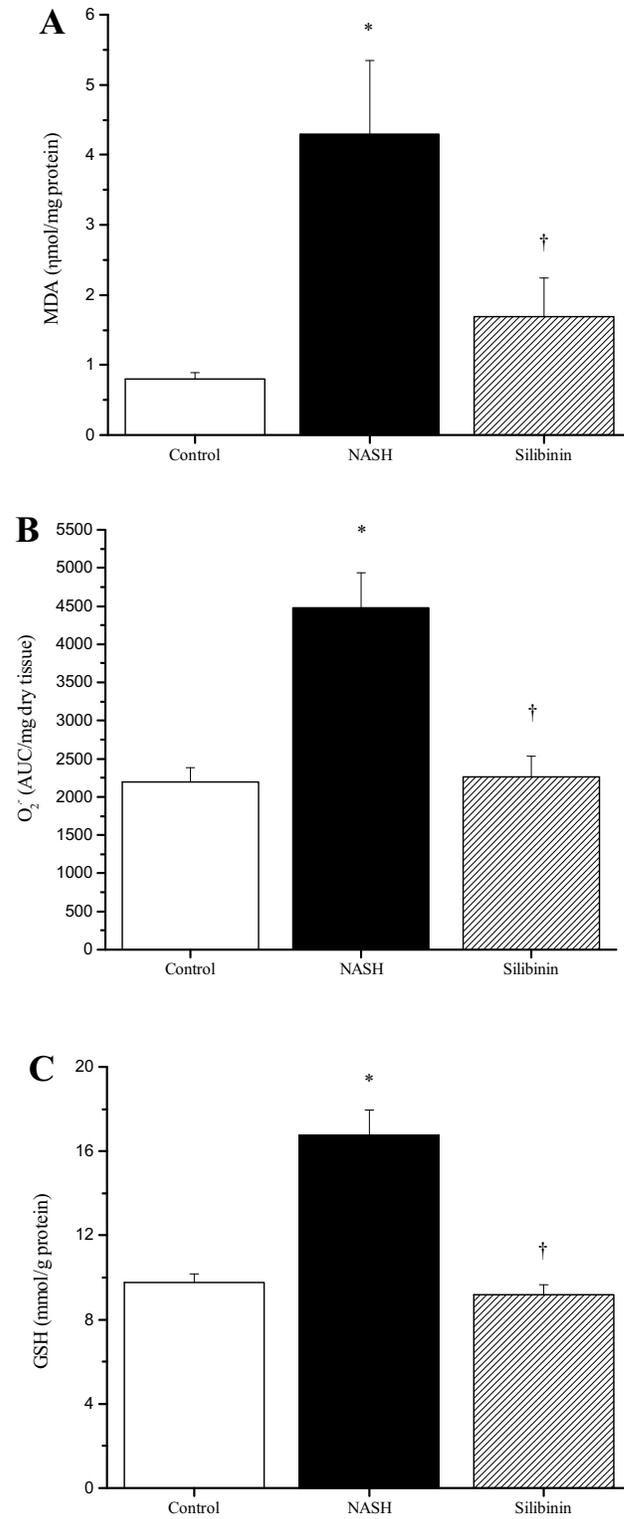


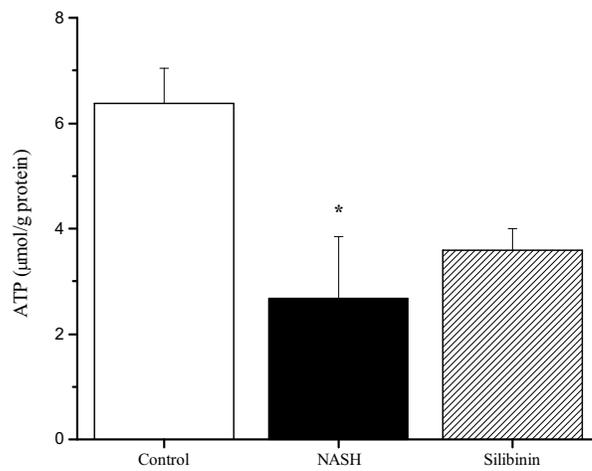
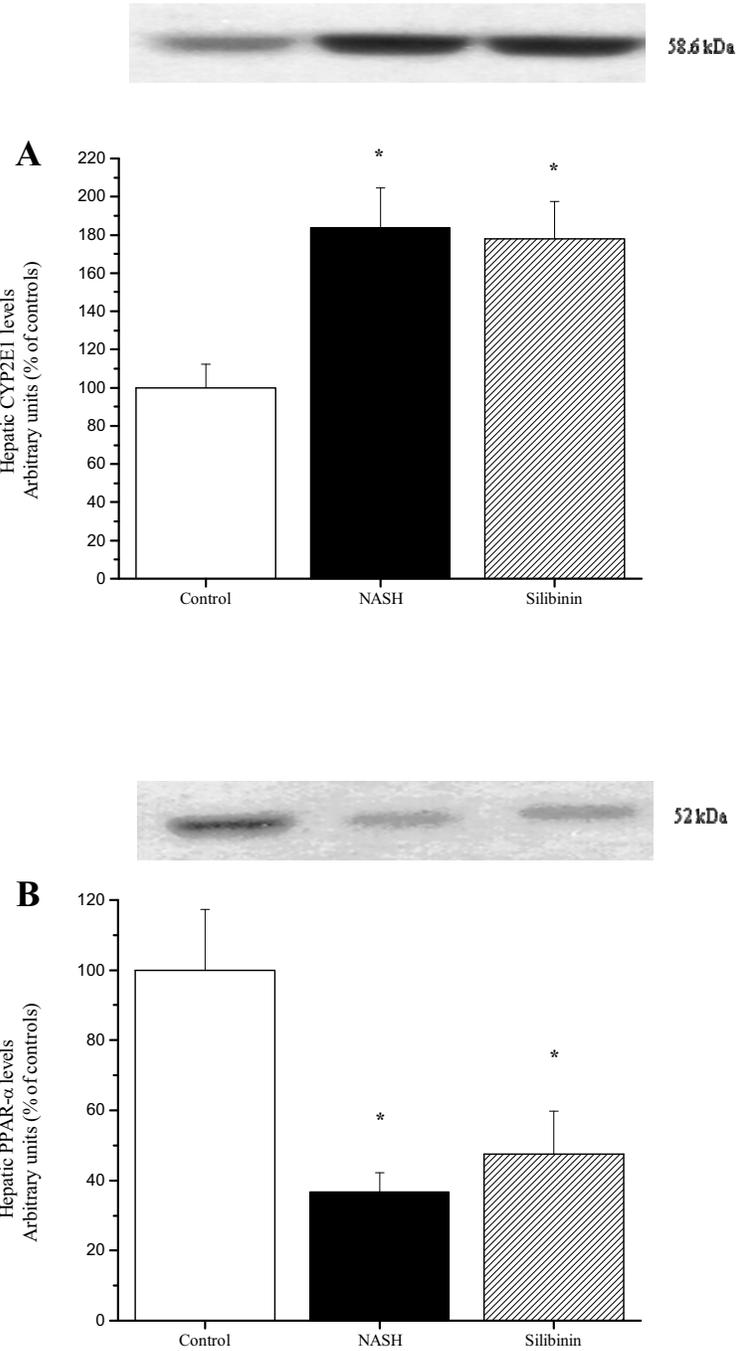
Figure 17

Figure 18



CHAPITRE IV : DISCUSSION

Dans les pays prospères, de nouvelles habitudes de vie ont conduit à l'émergence de l'obésité et des maladies reliées à la stéatose hépatique, qui peuvent évoluer en stéatohépatite chez certains patients. La stéatohépatite non alcoolique est communément associée avec le syndrome métabolique, l'hyperlipidémie, l'obésité, l'hyperinsulinémie et le diabète de type II. Cependant, cette maladie peut aussi bien affecter des personnes qui ne sont ni obèses, ni diabétiques. Les facteurs déclenchant les changements histologiques typiques de la stéatohépatite ne sont pas clairement identifiés mais il apparaît de plus en plus évident que le NASH se développe en étroite association avec la résistance à l'insuline. Malgré son caractère asymptomatique, le NASH touche plus de 3 % de la population générale et représente la maladie chronique du foie la plus répandue dans les pays de l'Ouest.

Plusieurs cercles vicieux impliquant la peroxydation des lipides, la formation de ROS, la dysfonction mitochondriale, la déplétion des antioxydants et la génération de cytokines inflammatoires peuvent induire la fibrose hépatique, qui peut éventuellement aboutir en cirrhose terminale.

Jusqu'à présent, il n'existe aucune thérapie efficace pour le NASH. Les traitements actuels s'appuient principalement sur un changement capital des habitudes de vie notamment l'exercice physique, la perte modérée mais soutenue du poids et l'adoption d'un régime alimentaire sain. Néanmoins, le développement d'une thérapie pharmacologique pourrait bénéficier particulièrement à tout patient pour qui le maintien de la perte du poids et de l'exercice à long terme est une tâche difficile à accomplir; une situation fréquente chez la plupart des patients obèses. Le traitement pharmacologique pourrait aussi profiter aux patients qui ne présentent pas de complications ou de facteurs de risques associés à la maladie, tels que les patients non obèses, non diabétiques et ayant un profil lipidique normal. Par ailleurs, les avenues thérapeutiques émergentes se concentrent sur l'amélioration de l'état d'insulino-résistance ainsi que sur la réduction de l'inflammation et du stress oxydatif.

Dans la présente étude, nous avons, en premier lieu, mis au point un modèle *in vivo* expérimental de NASH basé sur l'administration d'une diète riche en lipides chez le rat. Nous avons ensuite évalué le potentiel thérapeutique du NCX 1000 sur ce modèle de NASH et trouvé la dose optimale à administrer dans ce contexte. De plus, nous avons comparé les effets de la dose optimale trouvée pour le NCX 1000 avec les effets d'une dose équimolaire de la substance mère, l'UDCA. Nous avons subséquemment évalué l'impact de la combinaison d'une faible dose de NCX 1000 avec la vitamine E, un antioxydant lipophile, sur les lésions de la stéatohépatite expérimentale. Enfin, nous avons procédé à l'évaluation des effets bénéfiques de la silibinine, molécule polyphénolique extraite du Chardon-Marie, sur le même modèle de NASH chez le rat.

4.1 MISE AU POINT DU MODÈLE

Le modèle expérimental développé par Lieber et ses collègues, offrant une diète liquide riche en lipides aux rats pendant trois semaines pour induire le NASH, a servi de matrice pour la mise au point du modèle présenté dans cette étude [44]. Toutefois, un délai de trois semaines tel que proposé par ces chercheurs s'est avéré insuffisant pour induire les dommages hépatocytaires significatifs d'une stéatohépatite. Or, nos résultats ont démontré que la prolongation de la durée du traitement à une période de 6 à 12 semaines, a permis le développement de ces lésions telles que décrites dans la littérature, reproduisant ainsi la majorité des expressions cliniques de la maladie humaine. Le mécanisme par lequel ce modèle induit la stéatohépatite est bien documenté. Il s'appuie sur la théorie des deux attaques, énoncée par Day et James il y a près d'une décennie, qui accuse la stéatose et la résistance à l'insuline d'être les principaux déclencheurs de la maladie, représentant ainsi la première attaque [11].

Dans notre modèle, la stéatose est clairement exhibée par l'hépatomégalie (accroissement de la taille du foie) et par l'accumulation de macrovésicules de lipides à l'intérieur des hépatocytes, prouvée par l'histologie des foies des animaux malades. En effet, toutes les études s'accordent unanimement pour placer la stéatose comme

première étape dans le développement du NASH. Ainsi, un apport accru en lipides suite à l'ingestion d'une diète riche en gras, augmente la recapture des acides gras libres par les hépatocytes ce qui sature les voies principales de leur métabolisme. De la sorte, il y a une surcharge de la β -oxydation des AGL au sein des mitochondries, une augmentation de leur estérification en triglycérides (TG) et une accumulation de ces derniers à l'intérieur de vésicules lipidiques qui finissent par engorger le cytoplasme des hépatocytes [16, 40]. Ceci donne lieu à une stéatose macrovésiculaire et des hépatocytes ballonnés tels qu'observés dans nos coupes histologiques des rats du groupe NASH, ainsi qu'une augmentation de la taille et du poids des foies pour ces mêmes rats. Toutefois, le poids des animaux malades n'était pas plus élevé que celui des animaux témoins, indiquant que ces animaux n'étaient pas obèses. Effectivement, cette situation est souvent rencontrée sur la scène clinique [149] et expérimentale [58] et plusieurs études affirment que le NASH est attribué à l'adiposité abdominale plutôt qu'à l'obésité générale [6, 150] constituant, par conséquent, un facteur de risque important mais non indispensable au développement du NASH [151].

Dans notre modèle, l'hyperinsulinémie et une élévation de l'indice HOMA-IR chez les animaux du groupe NASH sont indicatifs de la présence d'une résistance à l'insuline, un indice puissant et bien reconnu des NAFLD [14, 15, 22, 152]. En clinique, on rapporte que la majorité des patients atteints de NASH souffre aussi d'insulino-résistance [38]. L'IR est connue pour faciliter l'accumulation de lipides dans le foie et donc de jouer un rôle majeur dans la promotion de la stéatose [38, 153]. En fait, en favorisant la lipolyse dans les tissus adipeux, l'IR contribue à l'augmentation de la relâche des AGL dans le sang et à leur acheminement vers le foie via la circulation porte. De plus, elle prohibe l'oxydation mitochondriale et appuie l'accumulation des lipides dans le foie. Finalement, elle inhibe la formation de l'apo B-100, protéine nécessaire à l'exportation des triglycérides de l'hépatocyte vers la circulation sanguine, ce qui soutient la stéatose [16, 17]. Par ailleurs, dans notre modèle, la glycémie était invariable entre le groupe malade et le groupe témoin, ce qui suggère un état pré-diabétique.

Les aminotransférases sériques (AST et ALT) sont des marqueurs utilisés en clinique pour le diagnostic de lésions hépatiques. Ces enzymes se trouvent à l'intérieur des hépatocytes et ne peuvent diffuser hors des cellules dans les conditions normales. Lorsque les hépatocytes subissent des dommages, la membrane plasmique peut être endommagée et une fuite des composants intracellulaires dont ces enzymes s'en suit. Alors la détection de leurs niveaux anormaux dans le sérum devient possible. Or, Park et ses collaborateurs ont récemment démontré que le niveau d'enzymes hépatiques ne peut être utilisé comme marqueur pour reconnaître la stéatose du NASH chez des jeunes coréens [154]. Ce ne sont donc pas des marqueurs spécifiques au NASH mais plusieurs études ont trouvé un niveau élevé d'ALT et d'AST chez des rats [80, 84, 87, 140] et des patients [70, 95, 114, 116] atteints de NASH. Au contraire, les niveaux de ces enzymes étaient in affectés par notre modèle de diète riche en lipides, ce qui concorde avec les données reportées par Lieber et ses collaborateurs [44]. En effet, plusieurs patients souffrants de NASH peuvent avoir un niveau de transaminases normal, comme rapportent de nombreuses études [155-158]. De plus, une récente étude a démontré que l'induction du NASH chez le rat avec une diète composée à 100% de lipides provoquait une baisse des transaminases sériques, probablement due à un manque de vitamines essentielles à la formation de ces enzymes [58]. Par conséquent, ce facteur n'était pas décisif dans la mise au point du présent modèle.

La dyslipidémie est une composante du syndrome métabolique souvent rencontrée chez les patients atteints de NASH. Cette perturbation du bilan lipidique est confirmée dans notre modèle par les niveaux anormaux des LDL, des HDL et des TG plasmatiques des rats à jeun du groupe NASH. En effet, les niveaux élevés de LDL et de HDL sont, d'une part, la conséquence d'un apport élevé en gras saturés à l'organisme, offrant ainsi une plus grande quantité d'acétyl CoA dans les hépatocytes pour la production de cholestérol, et d'autre part le résultat d'un dysfonctionnement dans le métabolisme des lipides [59]. Étonnamment, le taux de cholestérol total n'était pas influencé par 12 semaines de diète riche en lipides. Par ailleurs, la diminution du taux de TG plasmatiques chez les animaux malades reflète possiblement un problème dans la synthèse d'Apo B-100, composante nécessaire à leur processus d'extrusion à

partir des hépatocytes vers la circulation sanguine. Comme mentionné plus tôt, l'hyperinsulinémie pourrait donc être à l'origine de ce problème puisqu'elle exerce un effet inhibiteur sur la formation de cette protéine [159].

Le foie stéatosique est plus vulnérable face aux menaces potentielles et représente un environnement propice à la génération du stress oxydatif, qui correspond à la deuxième attaque selon la théorie de Day et James [11]. En effet, le stress oxydatif est de plus en plus reconnu comme étant l'élément clé du passage d'un état de stéatose hépatique bénigne vers une stéatohépatite. De plus, il constitue le mécanisme central de l'induction des lésions hépatocytaires dans le NASH. Dans notre modèle, plusieurs facettes du stress oxydatif ont clairement été démontrées chez les animaux du groupe NASH.

Tout d'abord, l'augmentation accrue de la génération de l'anion superoxyde dans le foie des animaux du groupe NASH est un indice de la présence du stress oxydatif dans notre modèle. En effet, l' $O_2^{\cdot-}$ est un radical libre produit par la chaîne respiratoire des mitochondries et dont la génération est accrue en cas de surcharge de l'oxydation mitochondriale ou d'une perturbation dans la respiration cellulaire. La surproduction de radicaux libres est un élément démontré dans la majorité des études expérimentales [160, 161] et cliniques [162] portant sur le NASH. Ces ROS peuvent ensuite déclencher plusieurs cercles vicieux résultant en dommages aux membranes plasmiques, aux organelles intracellulaires, à l'ADN mitochondrial et cellulaire, aux protéines affectées à la chaîne respiratoire ainsi qu'aux lipides accumulés dans le foie stéatosique.

Ainsi, dans la présente étude, l'augmentation des ROS hépatiques a induit la peroxydation des lipides, représentée par une augmentation marquée de la production de MDA dans les foies des rats du groupe NASH. Un profil très similaire de la peroxydation lipidique a été reporté par diverses études expérimentales sur les rats ayant reçu une diète riche en gras pour l'induction du NASH [31, 44, 80, 84, 87, 163] de même que par des études cliniques [22, 164]. Le MDA, un aldéhyde dangereux, perpétue et amplifie les effets délétères des radicaux libres en perturbant l'homéostasie

cellulaire. La peroxydation des PUFAs conduit, par exemple, à une défaillance de la synthèse des nucléotides et des protéines, à une déplétion des antioxydants naturels, à une dysfonction mitochondriale, à la production de cytokines inflammatoires, à l'augmentation de la production de ROS, à la nécrose hépatocytaire et à la fibrose [40, 63, 79]. Ainsi, le rôle de la peroxydation lipidique dans la pathogénèse du NASH est très bien documenté et constitue un pilier majeur du stress oxydatif et des dommages nécroinflammatoires qui en découlent.

De plus, notre modèle confirme l'augmentation du niveau hépatique de glutathion réduit, qui est un indice de l'induction de la défense antioxydante intracellulaire. Cette élévation du GSH, l'antioxydant naturel majeur du foie, illustre les efforts compensatoires déployés par les hépatocytes afin de pallier aux attaques oxydantes des ROS et des lipides toxiques. Deux récentes études décrivent le même profil ascendant de GSH total sanguin dans un modèle de NASH chez le rat, suite à la consommation chronique d'une diète composée à 100 % de lipides [58, 59]. Cette observation est aussi présente chez les patients souffrant de NASH [56, 57]. Par ailleurs, une dysfonction pourrait survenir lorsque ce système de défense est complètement surpassé par une production démesurée de radicaux libres, notamment aux stades avancés de la stéatohépatite, causant ainsi une déplétion de GSH. Conséquemment, le NASH est aussi associé à des niveaux très bas de GSH chez certains patients [54, 55]. Par contre, le fait que nous réussissons à mesurer clairement les éléments du stress oxydatif (MDA et $O_2^{\cdot-}$) montre bien les capacités antioxydantes sont dépassées dans notre modèle, malgré l'augmentation du GSH.

Lorsqu'une dysfonction mitochondriale survient, des voies alternatives à l'oxydation des AGL telles que la β -oxydation peroxysomale et l' ω -oxydation microsomale sont activées, ce qui résulte en surplus de production de radicaux libres et de corps cétonés [40, 41]. L'accumulation de corps cétonés induit l'expression du CYP2E1, enzyme responsable de leur métabolisme [11, 41, 42]. Une ingestion chronique de la diète riche en gras a provoqué une induction de l'expression du cytochrome P450 CYP 2E1, élément catalyseur du stress oxydatif, chez les rats du groupe NASH. Le CYP 2E1 est une source microsomale majeure de stress oxydatif.

De plus, des travaux d'inhibition *in vitro* ont démontré que cet enzyme est le catalyseur majeur de la lipotoxicité chez les souris [165]. Une expression accrue du CYP 2E1 a été notée dans plusieurs études tant chez des rats ayant développé le NASH suite à un régime riche en lipides [44, 46, 80] que chez des patients atteints de cette maladie [43, 47, 48].

Une autre conséquence directe de la peroxydation des lipides et du stress oxydatif, telle que mentionnée auparavant, est la dysfonction mitochondriale qui semble être un élément crucial dans l'événement de la seconde attaque. Dans notre modèle, celle-ci est constatée par la réduction du niveau d'ATP hépatique. Ces résultats sont soutenus par les travaux de Vendemiale et ses collaborateurs qui ont démontré que le NASH est associé à une baisse de la production d'ATP hépatique chez les rats [166]. Chez les patients atteints de NASH, cette situation est représentée par la lenteur de la reconstitution des stocks d'ATP après une infusion de fructose causant une déplétion aigue d'ATP [167]. Plusieurs auteurs reconnaissent que la baisse de la production d'ATP est un élément constitutionnel de la pathogénèse du NASH expérimental [63, 79]. Elle survient suite à une perturbation du transfert des électrons dans la chaîne respiratoire, ce qui induit une plus grande génération des radicaux libres de l'oxygène. Ces ROS induisent la transcription de la protéine découplante de la phosphorylation oxydative mitochondriale 2 (« mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupling protein 2 » ou UCP-2) qui, comme l'indique son nom, découple l'ATP-synthase du reste de la chaîne respiratoire [168]. Le résultat net est donc une consommation d'oxygène et une génération de ROS mais sans production d'ATP.

Par ailleurs, une augmentation du niveau plasmatique de TNF- α a été notée chez les rats du groupe NASH dans cette étude. Ceci confirme l'état inflammatoire des foies de ces animaux. L'augmentation de la production de TNF- α chez les rats ayant développé le NASH expérimentalement, suite à l'ingestion d'une diète lipidique, est confirmée par différentes études dont celle de Lieber et ses collaborateurs [31, 44, 80, 84, 163, 169]. Des niveaux élevés de TNF- α sont aussi trouvés chez des patients obèses souffrant de NASH [24, 170]. Les ROS et les aldéhydes toxiques stimulent la

production de cytokines proinflammatoires, dont le TNF- α . Cette cytokine associée à l'insulino-résistance contribue à la stéatose, induit des réactions inflammatoires et fibrotiques et joue un rôle important dans la progression de la stéatohépatite [171].

Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le TNF- α et l'adiponectine exercent des effets antagonistes sur les tissus-cibles [172]. L'adiponectine est une adipokine exclusivement sécrétée par le tissu adipeux pour stimuler la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des lipides et les effets anti-inflammatoires dans le foie. Des niveaux réduits d'adiponectine sont constatés chez des patients atteints de NASH [25, 29, 32, 173] et corrélerent avec le degré de nécroinflammation et de fibrose [35, 174]. Par ailleurs, l'adiponectine et le TNF- α régulent de façons opposées le métabolisme des lipides via l'activité du PPAR- α , tel qu'illustré par deux études récentes [175, 176]. L'expression hépatique de ce dernier est d'ailleurs réduite dans les modèles animaux de NASH [31, 80] et indique une défaillance dans l'oxydation des lipides qui contribue à leur accumulation excessive dans les hépatocytes. Dans notre modèle, l'augmentation du niveau plasmatique du TNF- α chez les rats du groupe NASH, suite à la consommation de diète riche en gras durant 12 semaines, était accompagnée par une réduction du niveau sanguin d'adiponectine et de l'expression hépatique du PPAR- α . Cette observation est complètement reproduite par une étude récente sur un modèle nutritionnel de NASH chez le rat [31].

Enfin, l'analyse histologique des foies des rats du groupe NASH a révélé, en plus de la stéatose, la présence d'hépatocytes ballonnés, de zones de nécrose, d'une infiltration de cellules immunitaires (telles que des leucocytes et des polymorphonucléaires neutrophiles), des corps de Mallory et des dépôts de collagène; traits histopathologiques dominants du NASH cités en littérature [24, 40, 67, 177, 178]. Ces lésions sont dues aux produits de la peroxydation des lipides et aux ROS qui, en s'attaquant à la membrane cellulaire, causent un ballonnement hépatocytaire et la nécrose [50]. La présence de nécrose est aussi confirmée par un taux élevé de lactate déshydrogénase (LDH), un indice de mort cellulaire. Ces dommages déclenchent une réaction inflammatoire en recrutant les cellules blanches immunitaires par

chimiotactisme [53] et en induisant la production de cytokines proinflammatoires. Les ROS et les aldéhydes toxiques peuvent activer les cellules stellaires hépatiques [51] qui, d'une part synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire et lient les protéines de cytokératine pour former les corps de Mallory [40, 52] et d'autre part sécrètent les fibres de collagène [67, 68].

Ainsi, notre modèle *in vivo* de NASH induit par l'ingestion d'une diète riche en lipides durant 12 semaines et basé sur le modèle de Lieber et ses collègues, a adéquatement reproduit la maladie humaine tant sur le plan histologique que sur le plan physiopathologique. De plus, les mécanismes sous-tendant les lésions hépatocytaires correspondent nettement à ceux décrits par la théorie des deux attaques de la pathogénèse du NASH. Par ailleurs, nos études préliminaires ont révélé que les lésions cardinales de la stéatohépatite étaient, en tout point, bien établies dans notre modèle à partir de la sixième semaine de consommation de la diète lipidique, en concordance avec la description de la pathologie dans la littérature. Nous avons donc commencé les traitements à ce moment avec l'intention d'évaluer le renversement de la maladie.

4.2 LE TRAITEMENT AVEC LE NCX 1000

Le NCX 1000 est un composé formé de l'UDCA auquel a été greffée une molécule de nitrate organique à l'aide d'un espaceur chimique. Ainsi, le NCX 1000 est une molécule qui, après son absorption, est captée directement par le foie pour y libérer le NO d'une manière contrôlée. Dans notre étude, le NCX 1000 a été administré aux rats par gavage à des doses de 15, 30 et 60 mg/kg (N15, N30 et N60, respectivement). Lors d'expériences préliminaires, la dose de 60 mg/kg n'a démontré aucune efficacité pour le traitement des lésions de la stéatohépatite, probablement à cause d'une limitation dans la solubilité de ce composé. Cette dose a donc été exclue des expériences ultérieures. La dose de 30 mg/kg a été sélectionnée en se basant sur le fait qu'elle équivaudrait théoriquement à 17.2 mg/kg d'UDCA, dose qui est

légèrement plus élevée que la limite supérieure de l'intervalle thérapeutique normal utilisé en clinique pour ce produit (5-15 mg/kg) [135].

Les résultats de cette étude démontrent premièrement que le traitement avec 30 mg/kg de NCX 1000 durant six semaines s'est avéré très efficace pour contrecarrer le développement du NASH, malgré l'ingestion ininterrompue de la diète riche en lipides. En effet, une amélioration remarquable du degré de stéatose hépatique a été observée chez les rats du groupe N30. Ceci concordait avec la réduction importante de l'indice hépatique, probablement due à la diminution légère du poids du foie et de son contenu en lipides. Toutefois, les perturbations des niveaux de lipides sanguins, notamment les LDL, les HDL, les TG et le cholestérol total, observées chez les animaux du groupe NASH n'ont pas été corrigées avec le traitement N30. Effectivement, il semble que la faible induction du PPAR- α observée aie été insuffisante pour rétablir un métabolisme normal des lipides à l'intérieur du foie.

Par ailleurs, la normalisation de la glycémie, de l'insulinémie et du HOMA-IR témoigne d'une meilleure sensibilité à l'insuline. De plus, N30 a permis une régularisation des paramètres du stress oxydatif particulièrement la production de MDA par la peroxydation lipidique, la génération de l'anion superoxyde et le contenu hépatique en GSH. Une tendance à la normalisation de l'expression microsomale du CYP 2E1 appuie aussi ces résultats. Ces effets antioxydants ont préalablement été observés dans notre récente étude *in vitro* d'un modèle de toxicité de l'amiodarone mimant les dommages d'une stéatohépatite sur des hépatocytes de souris en culture [148].

Le traitement N30 s'est aussi avéré efficace pour réduire l'inflammation observée dans les coupes histologiques, indiquée par la diminution de l'infiltration de cellules immunitaires, du ballonnement hépatocytaire, des corps de Mallory et de la fibrose. Dans ce contexte, une étude effectuée par Fiorrucci et son équipe en 2001 sur un modèle de rats cirrhotiques a démontré que le NCX 1000 exerce un effet anti-fibrotique en diminuant la contraction des cellules stellaires productrices de collagène [145]. Ces chercheurs attribuent ces résultats à l'effet relaxant de la molécule de NO,

relâchée par le NCX 1000 spécifiquement dans le foie. De plus, une réduction importante du niveau de TNF- α circulant était accompagnée d'une tendance à la hausse de l'adiponectine sérique dans le groupe N30, suggérant que le NCX 1000 pourrait posséder des propriétés anti-inflammatoires. En effet, deux études confirment l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , par le NCX 1000 dans un modèle murin d'hépatite auto-immune [146] ou d'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène [143]. Par conséquent, l'amélioration de ces paramètres a assurément contribué à rétablir la sensibilité à l'insuline chez les animaux traités avec 30 mg/kg de NCX 1000 [16, 25]. Notre modèle illustre aussi un retour du niveau LDH circulant à des valeurs normales, telles que vues chez les rats témoins, confirmant que le foie des rats du groupe N30 est en meilleur état général. Or, les effets immunomodulateurs, anti-inflammatoires et cytoprotecteurs du NCX 1000 ont aussi été mis en lumière par quelques études antérieures [142-147].

De surcroît, le traitement N30 cause une augmentation non significative dans la production d'ATP mitochondrial. Ce fait peut être relié aux observations rapportées par Fiorucci et ses collègues stipulant que le NCX 1000 protège le foie via le maintien de l'hyperpolarisation du potentiel membranaire mitochondrial, la prévention de la translocation du cytochrome *c* des mitochondries et l'apoptose retardée [143]. Ces propriétés sont aussi attribuées à la libération de NO dans le foie, selon ces chercheurs. Toutefois, ce mécanisme n'a pas été investigué dans la présente étude.

Le traitement des animaux malades avec une plus faible dose de NCX 1000, (N15), semble être moins efficace que le traitement N30, particulièrement pour ce qui est des paramètres histologiques, de la glycémie, de la production de MDA et d'O₂^{•-} ainsi que de la relâche de LDH. Puisque la différence entre les groupes n'est pas statistiquement significative, on ne peut pas affirmer que le NCX 1000 agit d'une manière dose-dépendante sur ces paramètres dans notre modèle de NASH.

4.3 LE TRAITEMENT AVEC L'UDCA

La molécule-mère, l'UDCA, est un acide biliaire hydrophile connu pour ses multiples effets hépatoprotecteurs chez des patients atteints d'une variété de maladies hépatiques chroniques [179]. L'utilisation de l'UDCA comme référence dans notre étude a été choisie dans le but de comparer ses effets à ceux de son dérivé, le NCX 1000, à dose équimolaire. L'efficacité de l'UDCA comme traitement pour le NASH ne fait pas l'unanimité. Cependant, le manque d'études de grande envergure, randomisées, contrôlées et à double-insu rend impossible de trancher catégoriquement de l'efficacité de ce médicament dans ce contexte.

Récemment, Keith Lindor et son équipe de la clinique Mayo de Rochester, en collaboration avec Axcan Pharma, ont conduit une des premières études cliniques d'envergure sur le NASH, dans laquelle 166 patients ont été randomisés soit dans un groupe placebo, soit dans un groupe traité avec l'UDCA pour une période de 2 ans. Les résultats ont démontré une amélioration de la biochimie et de l'histologie hépatique du NASH, mais à un degré similaire dans les deux groupes, suggérant que l'UDCA n'est guère plus efficace que le placebo chez les patients souffrant du NASH [139]. Par contre, lors de cette étude, la majorité des patients ont eu des habitudes de vie plus saines, suggérant qu'une meilleure alimentation et de l'exercice physique seraient bénéfiques pour ces patients. De plus, une étude parue en 2005, visant à comparer une thérapie de vitamines (E et C) par opposition à une thérapie d'UDCA chez des patients diagnostiqués avec des NAFLD, a montré que les deux thérapies étaient aussi efficaces pour normaliser les enzymes hépatiques. Parallèlement, plusieurs études cliniques visant à évaluer le potentiel thérapeutique de l'UDCA sur le NASH ont révélé une amélioration des paramètres biochimiques mais des résultats variables quant à l'amélioration de la stéatose, de la nécroinflammation et de la fibrose [114, 136]. Récemment, Fan et son équipe ont démontré que l'UDCA est efficace dans la potentialisation de l'effet thérapeutique d'une diète faible en calories pour prévenir le développement de NASH, induit par la surconsommation de graisses chez le rat [140]. Dans notre étude, le traitement des rats NASH avec une dose de 17.2 mg/kg d'UDCA durant six semaines a révélé des effets antioxydants, anti-

inflammatoires, cytoprotecteurs et insulino-sensibilisateurs aussi rigoureusement similaires et remarquables que ceux du NCX 1000, à doses équimolaires.

De plus, dans notre modèle, l'UDCA a clairement réduit la stéatose, telle qu'observée dans les coupes histologiques ainsi que par le niveau de cholestérol et les HDL sanguins, tels que révélés par l'analyse biochimique. Une étude récente réalisée par Okan et ses collaborateurs appuie nos résultats en démontrant que l'administration de 25 mg/kg d'UDCA à des rats ayant développé une stéatose, suite à l'ingestion d'une diète déficiente en choline, a complètement régressé cette stéatose [138]. De plus, un modèle animal de stéatohépatite d'origine alcoolique, développé par Lukizskaya et son équipe, a montré une amélioration nette de la stéatose par le traitement avec l'UDCA [180, 181]. Enfin, d'autres recherches confirment le pouvoir hypolipidémiant du traitement avec l'UDCA chez les humains et les animaux [114, 140].

L'activité antioxydante de l'UDCA observée dans notre modèle a aussi été mise en lumière par plusieurs études, notamment dans un modèle de lésions hépatiques induites par l'alcool [182] et de diabète induit par l'alloxane [183] chez le rat. De plus, Ljubuncic et son équipe ont démontré que l'UDCA peut supprimer la lipoperoxydation dans un modèle expérimental d'hépatite choléstatique chez le rat [130]. Plus tard, en 2002, Buko et ses collaborateurs ont prouvé que l'UDCA possède des propriétés antioxydantes puisqu'il réduit la peroxydation des lipides, diminue la production d'anion superoxyde et contrôle la quantité de GSH réduit dans le foie [129]. Cependant, notre précédente étude *in vitro* n'attribue aucune activité antioxydante à l'UDCA, lorsqu'administré à raison de 20 μ M aux hépatocytes en culture traitées avec l'amiodarone pour induire des lésions de NASH [148]. Plusieurs explications peuvent être à l'origine de cette contradiction. La première réside dans les différents systèmes employés pour constater ces lésions de NASH, soit la culture cellulaire par opposition à l'expérimentation *in vivo*. Ces résultats contradictoires pourraient aussi être expliqués par le fait que l'induction du stress oxydatif dans les deux contextes expérimentaux est fortement différente, l'une étant par l'amiodarone et l'autre par la diète riche en lipides et donc via le syndrome métabolique.

Une toute récente étude indique que l'administration de l'UDCA prévient la dysfonction mitochondriale chez les rats traités avec l'alloxane [183]. Ce processus semble être intimement relié à l'inhibition de la génération du stress oxydatif par ce composé. De plus, une étude publiée en 2004 suggère que l'UDCA peut réduire le stress oxydatif mitochondrial dans des hépatocytes isolés de rat [184]. Aussi, Botla et ses collaborateurs ont démontré que l'UDCA peut inhiber le pore de transition mitochondrial dont l'ouverture pourrait causer la mort cellulaire [185]. Dans notre étude, l'UDCA provoque une légère hausse de la production d'ATP mitochondriale, légèrement moins puissante que celle causée par N30, et semble donc offrir une faible protection contre la dysfonction mitochondriale rencontrée dans le NASH expérimental. D'autres paramètres devraient être mesurés afin d'identifier l'ampleur de son action sur les mitochondries.

Par ailleurs, l'UDCA a exercé un effet anti-inflammatoire et cytoprotecteur, similaire à celui de son dérivé, tel qu'observé dans les coupes histologiques du foie. Dans un éditorial, le Dr. Douglas Heuman suggère que l'UDCA pourrait agir en stabilisant les membranes cytoplasmiques des hépatocytes, les protégeant ainsi contre les dommages causés par certains produits cytotoxiques. De plus, sa propriété hydrophile lui permet de compétitionner avec les acides biliaires endogènes hydrophobes et toxiques et de faciliter leur évacuation [133, 135]. Ces mécanismes d'action pourraient expliquer, du moins partiellement, l'effet cytoprotecteur de l'UDCA. Par ailleurs, nos résultats démontrent que l'UDCA possède des propriétés anti-fibrotiques. Dans ce sens, une très récente étude démontre que l'UDCA (25 mg/kg) protège contre la fibrose induite chez les rats par l'injection de CCl₄ durant 12 semaines [186]. Finalement, l'action anti-inflammatoire de l'UDCA est aussi représentée par la diminution du niveau de TNF- α circulant et par la légère augmentation de l'adiponectine dans notre modèle de NASH. Effectivement, l'UDCA a été efficace pour réduire le niveau de TNF- α chez des animaux ayant une cirrhose biliaire primitive [187] ou un dommage hépatique dû à une déficience auto-immune [188].

Puisque les cytokines proinflammatoires et les radicaux libres jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la résistance à l'insuline, il est logique de présumer que l'inhibition de ces derniers par l'UDCA confère à cette molécule un pouvoir insulino-sensibilisateur, tout comme son dérivé le NCX 1000. De plus, le traitement avec l'UDCA a démontré un effet glycémiorégulateur dans notre modèle, pareillement au traitement N30. Nos résultats sont appuyés par une étude récente qui a démontré que l'administration de l'UDCA peut normaliser le niveau de glucose et d'insuline chez les rats souffrant de diabète induit par l'alloxane [183].

Dans le foie, le métabolisme du NCX 1000 permet son partage en un groupe donneur de NO et en quantité équimolaire d'UDCA. Or, puisque l'effet thérapeutique obtenu par les deux traitements était maximal pour la majorité des paramètres analysés, il n'est donc pas possible de distinguer le meilleur traitement dans ce contexte, tel qu'il a été réalisable dans notre précédente étude *in vitro*. En effet, dans cette dernière, le NCX 1000 a offert une meilleure protection que l'UDCA à doses équimolaires aux hépatocytes en culture, traités avec l'amiodarone pour induire des lésions semblables à celles du NASH et ces effets ont été attribués à la molécule de NO. Évidemment, une comparaison directe entre un système *in vitro* et une étude *in vivo* n'est point possible. Cependant, la similitude des effets du traitement avec l'UDCA et du traitement avec le NCX 1000 argumente contre l'importance du rôle du NO dans notre modèle.

Nos résultats démontrent donc que le traitement avec l'UDCA est aussi efficace que le traitement avec N30 pour contrer les lésions de stéatohépatite induites par la consommation d'une diète riche en gras chez les rats à doses équimolaires.

4.4 LE TRAITEMENT AVEC UNE COMBINAISON DE NCX 1000 ET DE VITAMINE E

La combinaison d'antioxydants naturels avec les agents pharmacologiques est encouragée dans la perspective de diminuer la dose de médicaments chimiques ingérée

afin réduire le risque de développer des réactions adverses, tout en potentialisant l'efficacité de la thérapie chez les patients atteints de NASH. La vitamine E est un antioxydant lipophile connu pour ses effets bénéfiques sur les différentes maladies de la stéatose hépatique. En fait, elle réduit la peroxydation des lipides, améliore la fibrose, diminue l'inflammation et stabilise les membranes cellulaires grâce à sa liposolubilité [70, 91, 92, 189]. Une récente étude à double-insu, randomisée et contrôlée, portant sur 48 patients souffrant de NASH et traités avec une combinaison d'UDCA et de vitamine E a dévoilé une normalisation du niveau d'enzymes hépatiques et de l'histologie du foie [141]. De plus, les résultats de notre précédente étude *in vitro* ont démontré que la vitamine E, et non la vitamine C, a significativement augmenté le potentiel antioxydant et cytoprotecteur du NCX-1000 sur des hépatocytes de souris traités avec l'amiodarone [148]).

En se basant sur ces résultats, nous avons tenté de traiter les lésions de NASH induites par la consommation chronique d'une diète riche en lipides, par une thérapie combinant une faible dose de NCX 1000 (15 mg/kg) avec 100 mg/kg de vitamine E, administrée quotidiennement aux rats par gavage. Les résultats de la présente étude montrent que l'association de la vitamine E avec N15 augmente de manière significative les effets bénéfiques du NCX 1000, spécifiquement pour ce qui est de la lipoperoxydation et de la production de radicaux libres. Par conséquent, ces effets sont strictement similaires aux effets de N30 et de l'UDCA. Ceci démontre donc que la vitamine E confère une protection antioxydante additionnelle à celle du traitement N15 seul, et confirme par le fait même que le stress oxydatif est la cible principale de cette vitamine lipophile dans le NASH expérimental. D'autres études sont requises afin de caractériser plus précisément le meilleur ratio de NCX 1000 et de vitamine E nécessaire pour obtenir l'effet maximal avec les plus petites doses de médicament possibles.

4.5 LE TRAITEMENT AVEC LA SILIBININE

Le chardon-Marie (*Silybum marianum*) est la plante médicinale la plus largement utilisée à travers le monde pour ses effets bénéfiques sur le foie (Choksi, 2000). L'extrait standardisé du chardon-Marie le plus investigué est la silymarine dont le composant actif majeur est la silibinine. Les propriétés hépatoprotectrices de ces molécules ont été démontrées dans plusieurs études *in vitro* [190-192] et *in vivo* [105, 193-196], de même qu'en clinique [106, 108]. Dans notre modèle expérimental, l'administration d'une dose quotidienne de 200 mg/kg de silibinine (associée avec la phosphatidylcholine) pendant 5 semaines s'est avérée très efficace pour renverser la progression du NASH, malgré la consommation incessante de la diète riche en lipides.

En effet, notre étude démontre que la silibinine diminue grandement la stéatose hépatique telle qu'observée dans les coupes histologiques et cette amélioration est accompagnée par une normalisation du poids du foie, de l'indice hépatique et du niveau des lipides plasmatiques, notamment les LDL et les HDL. Cependant, le traitement avec la silibinine n'a pas réussi à rétablir l'expression hépatique du PPAR- α ni à régulariser l'expression du CYP 2E1 des fractions microsomales du foie. À cet égard, une étude parue en 1994 confirme que le mécanisme hépatoprotecteur de la silibinine n'implique pas l'inhibition du CYP 2E1 [197]. Par ailleurs, deux autres études rapportent une faible inhibition du CYP 2E1 *in vitro*, mais avec des doses très élevées de silymarine [187, 198].

De surcroît, la sensibilité à l'insuline est rétablie par le traitement avec la silibinine tel que suggéré par la normalisation de l'insulinémie et du HOMA-IR et ce, malgré la consommation ininterrompue de la diète grasse. Lors d'une étude clinique portant sur 60 patients cirrhotiques et diabétiques, Velussi et ses collaborateurs ont démontré qu'un traitement quotidien avec 600 mg de silymarine réduisait l'insulinémie chez ces patients en plus de diminuer la nécessité de l'administration exogène d'insuline [106]. De plus, une étude plus récente a montré que le traitement de patients atteints de NAFLD avec la silibinine (complexée avec la vitamine E et des phospholipides) diminuait significativement l'hyperinsulinémie présente chez ces

patients [199]. Par ailleurs, dans notre modèle la silibinine a montré une tendance à corriger la diminution du niveau d'adiponectine sérique et la production mitochondriale d'ATP; fait concordant avec le rétablissement de la sensibilité à l'insuline. La correction de la production mitochondriale d'ATP par la silibinine était significative dans notre précédente étude sur un modèle d'ischémie froide/reperfusion chaude d'un foie de rat [200]. De plus, deux études portant sur la toxicité hépatique du fer démontrent le potentiel bénéfique de la silibinine sur la fonction mitochondriale [201, 202].

D'un autre côté, les propriétés antioxydantes de la silibinine sont reflétées dans notre étude par le retour à la normale de tous les paramètres du stress oxydatif. De la même façon, l'effet hépatoprotecteur de la silibinine est confirmé par la normalisation du niveau circulant de LDH. Or, l'effet cytoprotecteur de la silibinine est attribuable à son pouvoir antioxydant et chélateur des radicaux libres et des produits lipidiques peroxydés. Effectivement, la silibinine supprime la production de radicaux libres, particulièrement celle de l'anion superoxyde [203]. De plus elle inhibe la peroxydation lipidique dans divers modèles de toxicité hépatique chez le rat [195, 204-206]. En fait, la silibinine peut directement interagir avec les composantes de la membrane cellulaire afin de prévenir les anomalies dans la fraction lipidique responsable du maintien de la fluidité normale des membranes et ainsi prévenir la peroxydation de ces lipides [196]. Nos résultats concordent aussi avec ceux d'une récente étude de Ramakrishnan et ses collaborateurs qui ont démontré que le traitement avec la silymarine réduit la peroxydation des lipides et normalise le niveau de GSH en rétablissant la défense antioxydante dans le foie des rats souffrant d'hépatocarcinogénèse [207]. De plus, la silymarine semble offrir une bonne protection hépatique et un potentiel antioxydant contre le dommage hépatocellulaire induit par la diéthylnitrosamine chez le rat [105]. Finalement, notre étude précédente appuie aussi nos résultats en montrant que la silibinine diminue la production de MDA et la génération de ROS en plus de régulariser le niveau de GSH dans un modèle d'ischémie-reperfusion du foie chez le rat [200].

Par ailleurs, le traitement avec la silibinine a amélioré significativement tous les marqueurs de l'inflammation induits par l'ingestion d'une diète riche en lipides chez les rats. Les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices de la silibinine ont été confirmées par des études démontrant que la silymarine supprime l'activité et l'expression du TNF- α [208-212] et stimule la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les lymphocytes. Min et ses collaborateurs ont nouvellement démontré que la silibinine supprime de façon non spécifique la sécrétion des cytokines proinflammatoires par les cellules Th-1 et stimule la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules Th-2 *in vitro* et *ex vivo* [213]. Cette observation a aussi été constatée par Deak et collègues chez des patients souffrant de maladies hépatiques chroniques reliées à l'alcool [190]. Par ailleurs, l'effet anti-fibrotique de la silymarine a été cité par plusieurs études [100, 111, 112, 211, 214].

En somme, nos résultats démontrent que la silibinine possède un effet antioxydant, insulino-sensibilisateur, anti-inflammatoire et anti-fibrotique dans un modèle expérimental de NASH chez le rat. D'autres études sont requises pour établir un profil dose-réponse *in vivo* de cette molécule dans le contexte du NASH expérimental.

CHAPITRE V : CONCLUSION

La présente étude nous a permis de mettre au point un modèle *in vivo* de stéatohépatite non alcoolique chez le rat, par l'ingestion d'une diète liquide riche en lipides. Ce modèle reproduit les lésions majeures du NASH décrites en littérature, autant par les dommages nécroinflammatoires que par les paramètres du stress oxydatif, de la stéatose et de l'insulino-résistance. Il fournit donc les conditions optimales pour l'évaluation du potentiel thérapeutique de certains composés en phase préclinique.

Ainsi, cette étude nous a permis de démontrer, pour la première fois, que le NCX 1000, à dose élevée, est efficace pour renverser la stéatose, le stress oxydatif, l'inflammation et l'insulino-résistance dans un modèle *in vivo* de NASH chez le rat. Cependant, ces actions bénéfiques étaient quasi identiques à celles de la molécule-mère, l'UDCA. Par ailleurs, les résultats de notre étude encouragent la combinaison d'une plus petite dose de NCX 1000 avec un antioxydant naturel lipophile, tel que la vitamine E, pour le traitement du NASH, puisque cette association semble être aussi efficace dans ce contexte.

D'un autre côté, nous avons démontré, pour la première fois, qu'un traitement thérapeutique avec la silibinine, administrée sous forme de complexe avec la phosphatidylcholine, est remarquable pour contrer les mêmes paramètres cardinaux d'une stéatohépatite expérimentale induite par une diète riche en graisses chez le rat.

En conclusion, les résultats obtenus dans la présente étude fournissent une piste de recherche intéressante pouvant mener au développement en clinique d'une thérapie innovatrice efficace contre le NASH et les maladies du syndrome métabolique.

LES PERSPECTIVES FUTURES

L'étude des voies signalétiques et des mécanismes sous-jacents aux divers effets du NCX 1000 et de l'UDCA présentés dans ce mémoire devrait constituer le point central des recherches ultérieures. En effet, la détermination des principales cibles moléculaires de ces composés pourrait permettre le développement éventuel de médicaments spécialisés pour le traitement de la stéatohépatite non alcoolique. Ainsi, ces études auraient pour but de mieux caractériser le rôle des paramètres clés de cette maladie tel que le TNF- α , l'adiponectine, le CYP 2E1, l'insuline, etc. De plus, d'autres études *in vivo* utilisant le modèle présenté dans ce mémoire pourraient être utiles pour déterminer les doses optimales de vitamine E et de NCX 1000 à combiner, pour obtenir une meilleure protection contre les lésions de stéatohépatite. Par ailleurs, des études élaborées de phase III randomisées et contrôlées portant sur des patients atteints de NASH seraient requises afin de mieux caractériser l'effet du NXC 1000 dans ce contexte.

Une toute récente étude clinique, parue en septembre dernier dans la revue scientifique *Journal of Medical Virology*, confirme l'effet hépatoprotecteur, anti-inflammatoire, insulino-sensibilisateur et anti-fibrotique du complexe Silybin-vitamine E-phospholipides chez des patients atteints d'une infection due à l'hépatite C et même chez des patients n'ayant qu'une stéatose hépatique (Falasca, 2008). Or, il serait intéressant d'évaluer ce complexe dans le cadre d'une étude randomisée et contrôlée sur des patients atteints spécifiquement de NASH. Ces études devraient également inclure un groupe témoin recevant des phospholipides seuls ou en combinaison avec la vitamine E afin d'évaluer leurs effets individuels, indépendamment de celui de la silibinine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al., *Type IV collagen 7s domain is an independent clinical marker of the severity of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage*. J Gastroenterol, 2007. 42(5): p. 375-81.
2. Westwater JO, Fainer D, *Liver impairment in the obese*. Gastroenterology, 1958. 34(4): p. 686-93.
3. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update*. World J Gastroenterol, 2008. 14(2): p. 185-92.
4. Adler M, Schaffner F, *Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients*. Am J Med, 1979. 67(5): p. 811-6.
5. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. 55(7): p. 434-8.
6. Farrell GC, Larter CZ, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S99-S112.
7. Sorbi D, Boynton J, Lindor KD, *The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(4): p. 1018-22.
8. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, et al., *Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C*. Hepatology, 2003. 38(2): p. 420-7.
9. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. 41(6): p. 1313-21.
10. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al., *The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years*. Hepatology, 1990. 11(1): p. 74-80.
11. Day CP, James OF, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. 114(4): p. 842-5.
12. Fernandez-Rodriguez OM, Rios A, Montoya M, et al., *Description of a new auxiliary heterotopic partial liver transplantation technique with portal vein arteriolization of applicability in heterotopic liver xenotransplantation*. Transplant Proc, 2003. 35(5): p. 2051-3.
13. Sakurai M, Takamura T, Ota T, et al., *Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol, 2007. 42(4): p. 312-7.
14. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2001. 50(8): p. 1844-50.
15. Sanyal AJ, *Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction?* Am J Gastroenterol, 2001. 96(2): p. 274-6.

16. Larter CZ, Farrell GC, *Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat?* J Hepatol, 2006. 44(2): p. 253-61.
17. Utzschneider KM, Kahn SE, *Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(12): p. 4753-61.
18. Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, et al., *Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance.* Gastroenterology, 2005. 128(5): p. 1381-90.
19. Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, et al., *Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats.* Diabetes, 1991. 40(11): p. 1397-403.
20. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al., *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease.* J Biol Chem, 2004. 279(31): p. 32345-53.
21. Kabir Z, *Adult chronic disease and childhood obesity: a life course approach in developing countries?* Int J Epidemiol, 2005. 34(2): p. 481-2.
22. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.* Gastroenterology, 2001. 120(5): p. 1183-92.
23. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, et al., *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function.* Nature, 1997. 389(6651): p. 610-4.
24. Crespo J, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, et al., *Are there predictive factors of severe liver fibrosis in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis?* Obes Surg, 2001. 11(3): p. 254-7.
25. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, et al., *Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?* Hepatology, 2004. 40(1): p. 46-54.
26. Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, et al., *Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2004. 41(6): p. 943-9.
27. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al., *Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms.* Diabetologia, 2005. 48(4): p. 634-42.
28. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.* Nat Med, 2002. 8(11): p. 1288-95.
29. Kamada Y, Matsumoto H, Tamura S, et al., *Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model.* J Hepatol, 2007. 47(4): p. 556-64.
30. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al., *Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice.* Hepatology, 2004. 40(1): p. 177-84.
31. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, et al., *A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury.* Am J Pathol, 2006. 169(3): p. 846-60.
32. Pagano C, Soardo G, Esposito W, et al., *Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease.* Eur J Endocrinol, 2005. 152(1): p. 113-8.

33. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. 423(6941): p. 762-9.
34. Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al., *Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin*. Gastroenterology, 2003. 125(6): p. 1796-807.
35. Musso G, Gambino R, Durazzo M, et al., *Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease*. Hepatology, 2005. 42(5): p. 1175-83.
36. Barzilai N, Wang J, Massilon D, et al., *Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action*. J Clin Invest, 1997. 100(12): p. 3105-10.
37. Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, et al., *Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy*. Hepatology, 2005. 41(4): p. 753-60.
38. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al., *NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome*. Hepatology, 2002. 35(2): p. 373-9.
39. Uygun A, Kadayifci A, Kubar A, et al., *Insignificant role of hepatitis G virus infection in patients with liver enzyme elevations of unknown etiology*. J Clin Gastroenterol, 2000. 31(1): p. 73-6.
40. Browning JD, Horton JD, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J Clin Invest, 2004. 114(2): p. 147-52.
41. Gonzalez FJ, *Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1*. Mutat Res, 2005. 569(1-2): p. 101-10.
42. Zangar RC, Novak RF, *Effects of fatty acids and ketone bodies on cytochromes P450 2B, 4A, and 2E1 expression in primary cultured rat hepatocytes*. Arch Biochem Biophys, 1997. 337(2): p. 217-24.
43. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, et al., *Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2003. 37(3): p. 544-50.
44. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al., *Model of nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Clin Nutr, 2004. 79(3): p. 502-9.
45. Raucy JL, Lasker JM, Kraner JC, et al., *Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat*. Mol Pharmacol, 1991. 39(3): p. 275-80.
46. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C, *Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation*. Gastroenterology, 1996. 111(6): p. 1645-53.
47. Emery MG, Fisher JM, Chien JY, et al., *CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2003. 38(2): p. 428-35.
48. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, et al., *Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 1998. 27(1): p. 128-33.
49. Caro AA, Cederbaum AI, *Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. 44: p. 27-42.

50. Esterbauer H, Ramos P, *Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1996. 127: p. 31-64.
51. Lee MH, Park JW, *Lipid peroxidation products mediate damage of superoxide dismutase*. Biochem Mol Biol Int, 1995. 35(5): p. 1093-102.
52. Fernandez V, Massa L, Quinones L, et al., *Effects of gamma-hexachlorocyclohexane and L-3,3',5-triiodothyronine on rat liver cytochrome P4502E1-dependent activity and content in relation to microsomal superoxide radical generation*. Biol Res, 2003. 36(3-4): p. 359-65.
53. Curzio M, Di Mauro C, Esterbauer H, et al., *Chemotactic activity of aldehydes. Structural requirements. Role in inflammatory process*. Biomed Pharmacother, 1987. 41(6): p. 304-14.
54. Machado MV, Ravasco P, Jesus L, et al., *Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet*. Scand J Gastroenterol, 2007: p. 1-8.
55. Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, et al., *Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis*. Clin Chim Acta, 2005. 355(1-2): p. 105-11.
56. Fierbinteanu-Braticevici C, Bengus A, Neamtu M, et al., *The risk factors of fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis*. Rom J Intern Med, 2002. 40(1-4): p. 81-8.
57. Koruk M, Taysi S, Savas MC, et al., *Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Ann Clin Lab Sci, 2004. 34(1): p. 57-62.
58. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, et al., *Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis*. J Med Assoc Thai, 2007. 90(4): p. 788-97.
59. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, et al., *N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis*. World J Gastroenterol, 2007. 13(38): p. 5127-32.
60. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, et al., *Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 1999. 31(3): p. 430-4.
61. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, et al., *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2003. 38(4): p. 999-1007.
62. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion, 2006. 6(1): p. 1-28.
63. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. 282(2): p. G193-9.
64. Pessayre D, Fromenty B, *NASH: a mitochondrial disease*. J Hepatol, 2005. 42(6): p. 928-40.
65. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, et al., *Mitochondria in steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. 21(1): p. 57-69.
66. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through*

- autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.* J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 890-8.
67. Lee RG, *Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler.* Hepatology, 1995. 21(6): p. 1742-3.
 68. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI, *Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species.* Hepatology, 2002. 35(1): p. 62-73.
 69. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, et al., *The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis.* Faseb J, 1997. 11(11): p. 851-7.
 70. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, et al., *Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study.* Aliment Pharmacol Ther, 2001. 15(10): p. 1667-72.
 71. Ikejima K, Takei Y, Honda H, et al., *Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat.* Gastroenterology, 2002. 122(5): p. 1399-410.
 72. Schuppan D, Afdhal NH, *Liver cirrhosis.* Lancet, 2008. 371(9615): p. 838-51.
 73. Berson A, De Beco V, Letteron P, et al., *Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes.* Gastroenterology, 1998. 114(4): p. 764-74.
 74. Chitturi S, Farrell GC, *Drug-Induced Liver Disease.* Curr Treat Options Gastroenterol, 2000. 3(6): p. 457-462.
 75. Fromenty B, Fisch C, Berson A, et al., *Dual effect of amiodarone on mitochondrial respiration. Initial protonophoric uncoupling effect followed by inhibition of the respiratory chain at the levels of complex I and complex II.* J Pharmacol Exp Ther, 1990. 255(3): p. 1377-84.
 76. Fromenty B, Fisch C, Labbe G, et al., *Amiodarone inhibits the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice.* J Pharmacol Exp Ther, 1990. 255(3): p. 1371-6.
 77. Varbiro G, Toth A, Tapodi A, et al., *Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. 307(2): p. 615-25.
 78. Cohen B, Barkan D, Levy Y, et al., *Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissues.* J Biol Chem, 2001. 276(11): p. 7697-700.
 79. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference.* Hepatology, 2003. 37(5): p. 1202-19.
 80. Zou Y, Li J, Lu C, et al., *High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis.* Life Sci, 2006. 79(11): p. 1100-7.
 81. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, et al., *High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat.* Diabetes Res Clin Pract, 1996. 31(1-3): p. 27-35.
 82. Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, et al., *A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-*

- polyunsaturated fat diet*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. 294(1): p. G27-38.
83. Deng QG, She H, Cheng JH, et al., *Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice*. Hepatology, 2005. 42(4): p. 905-14.
 84. Chen SW, Chen YX, Shi J, et al., *The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis*. Dig Dis Sci, 2006. 51(12): p. 2225-34.
 85. Harris JK, French SA, Jeffery RW, et al., *Dietary and physical activity correlates of long-term weight loss*. Obes Res, 1994. 2(4): p. 307-13.
 86. Watarai T, Kobayashi M, Takata Y, et al., *Alteration of insulin-receptor kinase activity by high-fat feeding*. Diabetes, 1988. 37(10): p. 1397-404.
 87. Yalniz M, Bahcecioglu IH, Kuzu N, et al., *Amelioration of steatohepatitis with pentoxifylline in a novel nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet*. Dig Dis Sci, 2007. 52(9): p. 2380-6.
 88. Dixon JB, Anderson M, Cameron-Smith D, et al., *Sustained weight loss in obese subjects has benefits that are independent of attained weight*. Obes Res, 2004. 12(11): p. 1895-902.
 89. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, et al., *Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life*. Gut, 2004. 53(3): p. 413-9.
 90. Hawley JA, Lessard SJ, *Exercise training-induced improvements in insulin action*. Acta Physiol (Oxf), 2008. 192(1): p. 127-35.
 91. Hasegawa T, Fukui Y, Tanano H, et al., *Factors influencing the outcome of liver transplantation for biliary atresia*. J Pediatr Surg, 1997. 32(11): p. 1548-51.
 92. Lavine JE, *Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a pilot study*. J Pediatr, 2000. 136(6): p. 734-8.
 93. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, et al., *Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Gastroenterol, 2003. 98(11): p. 2485-90.
 94. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, et al., *Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality*. Ann Intern Med, 2005. 142(1): p. 37-46.
 95. Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, et al., *Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study*. Am J Gastroenterol, 2001. 96(9): p. 2711-7.
 96. Barak AJ, Beckenhauer HC, Junnila M, et al., *Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosylmethionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration*. Alcohol Clin Exp Res, 1993. 17(3): p. 552-5.
 97. Osman E, Owen JS, Burroughs AK, *Review article: S-adenosyl-L-methionine--a new therapeutic agent in liver disease?* Aliment Pharmacol Ther, 1993. 7(1): p. 21-8.
 98. Gulbahar O KA, Ersoz G, Akarca US, Musoglu A, *Treatment of non-alcoholic steatohepatitis with N-acetylcysteine*. Gastroenterology, 2000. 118(A): p. 1444.
 99. El-Samaligy MS, Afifi NN, Mahmoud EA, *Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance*. Int J Pharm, 2006. 319(1-2): p. 121-9.

100. Luper S, *A review of plants used in the treatment of liver disease: part I*. *Altern Med Rev*, 1998. 3(6): p. 410-21.
101. Dehmlow C, Murawski N, de Groot H, *Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells*. *Life Sci*, 1996. 58(18): p. 1591-600.
102. Feher J, Lang I, Nekam K, et al., *Effect of free radical scavengers on superoxide dismutase (SOD) enzyme in patients with alcoholic cirrhosis*. *Acta Med Hung*, 1988. 45(3-4): p. 265-76.
103. Kren V, Walterova D, *Silybin and silymarin--new effects and applications*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005. 149(1): p. 29-41.
104. Lucena MI, Andrade RJ, de la Cruz JP, et al., *Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2002. 40(1): p. 2-8.
105. Pradeep K, Mohan CV, Gobianand K, et al., *Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2007. 560(2-3): p. 110-6.
106. Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, et al., *Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients*. *J Hepatol*, 1997. 26(4): p. 871-9.
107. Wellington K, Jarvis B, *Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders*. *BioDrugs*, 2001. 15(7): p. 465-89.
108. Barzaghi N, Crema F, Gatti G, et al., *Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin- phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1990. 15(4): p. 333-8.
109. Buzzelli G, Moscarella S, Giusti A, et al., *A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis*. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1993. 31(9): p. 456-60.
110. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, et al., *Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1993. 18(3): p. 289-97.
111. Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, et al., *Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine-Vitamin E complex in rats*. *Dig Liver Dis*, 2005. 37(11): p. 869-76.
112. Loguercio C, Federico A, Trappoliere M, et al., *The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study*. *Dig Dis Sci*, 2007. 52(9): p. 2387-95.
113. Pradhan SC, Girish C, *Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine*. *Indian J Med Res*, 2006. 124(5): p. 491-504.
114. Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, et al., *Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study*. *Hepatology*, 1996. 23(6): p. 1464-7.

115. Basaranoglu M, Acbay O, Sonsuz A, *A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 1999. 31(2): p. 384.
116. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, et al., *Probucol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study*. J Hepatol, 2003. 38(4): p. 414-8.
117. Carvalho C, Correia S, Santos MS, et al., *Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment*. Mol Cell Biochem, 2008. 308(1-2): p. 75-83.
118. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, et al., *Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study*. Biochem J, 2004. 382(Pt 3): p. 877-84.
119. Lenhard JM, Kliewer SA, Paulik MA, et al., *Effects of troglitazone and metformin on glucose and lipid metabolism: alterations of two distinct molecular pathways*. Biochem Pharmacol, 1997. 54(7): p. 801-8.
120. Zhou G, Myers R, Li Y, et al., *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest, 2001. 108(8): p. 1167-74.
121. Duseja A, Das A, Dhiman RK, et al., *Metformin is effective in achieving biochemical response in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) not responding to lifestyle interventions*. Ann Hepatol, 2007. 6(4): p. 222-6.
122. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al., *Metformin in non-alcoholic steatohepatitis*. Lancet, 2001. 358(9285): p. 893-4.
123. de Oliveira CP, Stefano JT, de Siqueira ER, et al., *Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Hepatol Res, 2008. 38(2): p. 159-65.
124. Comar KM, Kirby DF, *Herbal remedies in gastroenterology*. J Clin Gastroenterol, 2005. 39(6): p. 457-68.
125. Oneta CM, Dufour JF, *Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations*. Swiss Med Wkly, 2002. 132(35-36): p. 493-505.
126. Sekino N, Kashiwabara A, Inoue T, et al., *Usefulness of troglitazone administration to obese hyperglycaemic patients with near-normoglycaemia*. Diabetes Obes Metab, 2003. 5(3): p. 145-9.
127. Caldwell SH, Hespdenheide EE, Redick JA, et al., *A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Gastroenterol, 2001. 96(2): p. 519-25.
128. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, et al., *A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2004. 39(1): p. 188-96.
129. Buko VU, Lukivskaya OY, Zavodnik LV, et al., *Antioxidative effect of ursodeoxycholic acid in the liver of rats with oxidative stress caused by gamma-irradiation*. Ukr Biokhim Zh, 2002. 74(1): p. 88-92.
130. Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A, *Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease*. Dig Dis Sci, 2000. 45(10): p. 1921-8.
131. Pares A, Caballeria L, Rodes J, et al., *Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric*

- trial. UDCA-Cooperative Group from the Spanish Association for the Study of the Liver. J Hepatol, 2000. 32(4): p. 561-6.*
132. Kumar D, Tandon RK, *Use of ursodeoxycholic acid in liver diseases. J Gastroenterol Hepatol, 2001. 16(1): p. 3-14.*
 133. Angulo P, *Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. Curr Gastroenterol Rep, 2002. 4(1): p. 37-44.*
 134. Chen L, Borozan I, Milkiewicz P, et al., *Gene expression profiling of early primary biliary cirrhosis: possible insights into the mechanism of action of ursodeoxycholic acid. Liver Int, 2008.*
 135. Trauner M, Graziadei IW, *Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. Aliment Pharmacol Ther, 1999. 13(8): p. 979-96.*
 136. Georgescu EF, Georgescu M, *Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. J Gastrointest Liver Dis, 2007. 16(1): p. 39-46.*
 137. Kiyici M, Gulten M, Gurel S, et al., *Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. Can J Gastroenterol, 2003. 17(12): p. 713-8.*
 138. Okan A, Astarcioglu H, Tankurt E, et al., *Effect of ursodeoxycholic acid on hepatic steatosis in rats. Dig Dis Sci, 2002. 47(11): p. 2389-97.*
 139. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, et al., *Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. Hepatology, 2004. 39(3): p. 770-8.*
 140. Fan JG, Zhong L, Tia LY, et al., *Effects of ursodeoxycholic acid and/or low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. World J Gastroenterol, 2005. 11(15): p. 2346-50.*
 141. Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ, et al., *Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin e in nonalcoholic steatohepatitis. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. 4(12): p. 1537-43.*
 142. Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, et al., *NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. J Hepatol, 2003. 39(6): p. 932-9.*
 143. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, et al., *Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. Br J Pharmacol, 2004. 143(1): p. 33-42.*
 144. Fiorucci S, Antonelli E, Morelli A, *Nitric oxide and portal hypertension: a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid that selectively releases nitric oxide in the liver. Dig Liver Dis, 2003. 35 Suppl 2: p. S61-9.*
 145. Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, et al., *NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(15): p. 8897-902.*
 146. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, et al., *An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2652-7.*

147. Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, et al., *A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats*. J Hepatol, 2003. 39(6): p. 940-6.
148. Ouazzani-Chahdi A, Elimadi A, Chabli A, et al., *Combining ursodeoxycholic acid or its NO-releasing derivative NCX-1000 with lipophilic antioxidants better protects mouse hepatocytes against amiodarone toxicity*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. 85(2): p. 233-42.
149. Park KS, Lee YS, Park HW, et al., *Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Korean J Intern Med, 2004. 19(1): p. 19-26.
150. Park HS, Park JY, Yu R, *Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. 69(1): p. 29-35.
151. Omagari K, Kadokawa Y, Masuda J, et al., *Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. 17(10): p. 1098-105.
152. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. 107(5): p. 450-5.
153. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al., *Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association*. Hepatology, 2002. 35(2): p. 367-72.
154. Park JW, Jeong G, Kim SJ, et al., *Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. 22(4): p. 491-7.
155. Bayard M, Holt J, Boroughs E, *Nonalcoholic fatty liver disease*. Am Fam Physician, 2006. 73(11): p. 1961-8.
156. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. 40(6): p. 1387-95.
157. Mofrad PS, Sanyal AJ, *Nonalcoholic fatty liver disease*. MedGenMed, 2003. 5(2): p. 14.
158. Noguchi H, Tazawa Y, Nishinomiya F, et al., *The relationship between serum transaminase activities and fatty liver in children with simple obesity*. Acta Paediatr Jpn, 1995. 37(5): p. 621-5.
159. Cassader M, Gambino R, Musso G, et al., *Postprandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism and insulin sensitivity in nonalcoholic steatohepatitis patients*. Lipids, 2001. 36(10): p. 1117-24.
160. Hensley K, Kotake Y, Sang H, et al., *Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H(2)O(2) generation in liver mitochondria*. Carcinogenesis, 2000. 21(5): p. 983-9.
161. Laurent A, Nicco C, Tran Van Nhieu J, et al., *Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis*. Hepatology, 2004. 39(5): p. 1277-85.

162. Malaguarnera L, Rosa MD, Zambito AM, et al., *Potential role of chitotriosidase gene in nonalcoholic fatty liver disease evolution*. Am J Gastroenterol, 2006. 101(9): p. 2060-9.
163. Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, et al., *Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis*. Mediators Inflamm, 2006. 2006(6): p. 34295.
164. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(5): p. G1135-9.
165. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, et al., *CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis*. J Clin Invest, 2000. 105(8): p. 1067-75.
166. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, et al., *Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status*. Hepatology, 2001. 33(4): p. 808-15.
167. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, et al., *Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study*. Jama, 1999. 282(17): p. 1659-64.
168. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, et al., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature, 2002. 415(6867): p. 96-9.
169. Yalniz M, Bahcecioglu IH, Kuzu N, et al., *Preventive role of genistein in an experimental non-alcoholic steatohepatitis model*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. 22(11): p. 2009-14.
170. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. 48(2): p. 206-11.
171. Diehl AM, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. 282(1): p. G1-5.
172. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30*. Nat Med, 2002. 8(7): p. 731-7.
173. Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al., *Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2005. 54(1): p. 117-21.
174. Musso G, Gambino R, De Michieli F, et al., *Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH*. Hepatology, 2008. 47(4): p. 1167-77.
175. Shulman AI, Mangelsdorf DJ, *Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome*. N Engl J Med, 2005. 353(6): p. 604-15.
176. You M, Considine RV, Leone TC, et al., *Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice*. Hepatology, 2005. 42(3): p. 568-77.
177. Brunt EM, Tiniakos DG, *Pathological features of NASH*. Front Biosci, 2005. 10: p. 1475-84.
178. Nonomura A, Enomoto Y, Takeda M, et al., *Clinical and pathological features of non-alcoholic steatohepatitis*. Hepatol Res, 2005. 33(2): p. 116-21.

179. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD, *Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'*. J Hepatol, 2001. 35(1): p. 134-46.
180. Lukivskaya O, Zavodnik L, Knas M, et al., *Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis*. Adv Med Sci, 2006. 51: p. 54-9.
181. Lukivskaya OY, Maskevich AA, Buko VU, *Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver*. Alcohol, 2001. 25(2): p. 99-105.
182. Oliva L, Beauge F, Choquart D, et al., *Ursodeoxycholate alleviates alcoholic fatty liver damage in rats*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. 22(7): p. 1538-43.
183. Lukivskaya O, Patsenker E, Buko VU, *Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: link with oxidative stress*. Life Sci, 2007. 80(26): p. 2397-402.
184. Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, et al., *Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress*. Hepatology, 2004. 39(3): p. 711-20.
185. Botla R, Spivey JR, Aguilar H, et al., *Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. 272(2): p. 930-8.
186. Mas N, Tasci I, Comert B, et al., *Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis*. World J Gastroenterol, 2008. 14(7): p. 1108-11.
187. Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I, et al., *Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. 17(2): p. 196-202.
188. Ishizaki K, Iwaki T, Kinoshita S, et al., *Ursodeoxycholic acid protects concanavalin A-induced mouse liver injury through inhibition of intrahepatic tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-2 production*. Eur J Pharmacol, 2008. 578(1): p. 57-64.
189. Sanyal AJ, *AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. 123(5): p. 1705-25.
190. Deak G, Muzes G, Lang I, et al., *Effects of two bioflavonoids on certain cellular immune reactions in vitro*. Acta Physiol Hung, 1990. 76(2): p. 113-21.
191. Sonnenbichler J, Zetl I, *Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers*. Prog Clin Biol Res, 1986. 213: p. 319-31.
192. Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, et al., *Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. 11(23): p. 8441-8.
193. Kropacova K, Misurova E, Hakova H, *Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage*. Radiats Biol Radioecol, 1998. 38(3): p. 411-5.
194. Lang I, Nekam K, Deak G, et al., *Immunomodulatory and hepatoprotective effects of in vivo treatment with free radical scavengers*. Ital J Gastroenterol, 1990. 22(5): p. 283-7.

195. Letteron P, Labbe G, Degott C, et al., *Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant.* Biochem Pharmacol, 1990. 39(12): p. 2027-34.
196. Muriel P, Moreno MG, *Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004. 94(2): p. 99-104.
197. Miguez JM, Martin FJ, Aldegunde M, *Effects of single doses and daily melatonin treatments on serotonin metabolism in rat brain regions.* J Pineal Res, 1994. 17(4): p. 170-6.
198. Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, et al., *Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities.* Phytother Res, 2002. 16(7): p. 632-8.
199. Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, et al., *A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations.* Gut, 2006. 55(6): p. 901-2.
200. Ligeret H, Brault A, Vallerand D, et al., *Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury.* J Ethnopharmacol, 2008. 115(3): p. 507-14.
201. Masini A, Ceccarelli D, Giovannini F, et al., *Iron-induced oxidant stress leads to irreversible mitochondrial dysfunctions and fibrosis in the liver of chronic iron-dosed gerbils. The effect of silybin.* J Bioenerg Biomembr, 2000. 32(2): p. 175-82.
202. Pietrangelo A, Montosi G, Garuti C, et al., *Iron-induced oxidant stress in nonparenchymal liver cells: mitochondrial derangement and fibrosis in acutely iron-dosed gerbils and its prevention by silybin.* J Bioenerg Biomembr, 2002. 34(1): p. 67-79.
203. Varga Z, Czompa A, Kakuk G, et al., *Inhibition of the superoxide anion release and hydrogen peroxide formation in PMNLs by flavonolignans.* Phytother Res, 2001. 15(7): p. 608-12.
204. Campos R, Garrido A, Guerra R, et al., *Acetaminophen hepatotoxicity in rats is attenuated by silybin dihemisuccinate.* Prog Clin Biol Res, 1988. 280: p. 375-8.
205. Comelli MC, Mengs U, Schneider C, et al., *Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy.* Integr Cancer Ther, 2007. 6(2): p. 120-9.
206. Farghali H, Kamenikova L, Hynie S, et al., *Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury.* Pharmacol Res, 2000. 41(2): p. 231-7.
207. Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, et al., *Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats.* Chem Biol Interact, 2006. 161(2): p. 104-14.

208. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, et al., *Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis*. J Immunol, 1999. 163(12): p. 6800-9.
209. Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, et al., *Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin*. Gastroenterology, 2007. 132(5): p. 1925-36.
210. Schumann J, Prockl J, Kiemer AK, et al., *Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury*. J Hepatol, 2003. 39(3): p. 333-40.
211. Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, et al., *Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin*. Carcinogenesis, 2000. 21(4): p. 811-6.
212. Zi X, Mukhtar H, Agarwal R, *Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 239(1): p. 334-9.
213. Min K, Yoon WK, Kim SK, et al., *Immunosuppressive effect of silibinin in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Arch Pharm Res, 2007. 30(10): p. 1265-72.
214. Jia JD, Bauer M, Cho JJ, et al., *Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1*. J Hepatol, 2001. 35(3): p. 392-8.