

Université de Montréal

**Le rôle de la barrière hémato-encéphalique dans la pathogenèse de l'œdème chez
des rats souffrant d'insuffisance hépatique chronique**

Par

Jimmy HUYNH

Université de Montréal, Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

pour l'obtention du grade de Maîtrise Sciences (M. Sc.)

en sciences biomédicales

option générale

Avril 2011

©, Jimmy HUYNH, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et post-doctorales

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle de la barrière hémato-encéphalique dans la pathogenèse de l'œdème chez
des rats souffrant d'insuffisance hépatique chronique**

Présenté par :
Jimmy HUYNH

a été évalué par un comité de jury composé des personnes suivantes :

Dre Nathalie Arbour

**Département de Médecine
CRCHUM-Hôpital Notre-Dame
Université de Montréal**

Président-rapporteur

Dr Christopher Rose

**Département de Médecine
CRCHUM-Hôpital St-Luc
Université de Montréal**

Directeur de recherche

Dre Nicole Leclerc

**Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal**

Membre du jury

Résumé

L'œdème cérébral est une complication associée à l'encéphalopathie hépatique (EH) lors d'une insuffisance hépatique chronique (cirrhose du foie). Présentement, l'origine de sa pathogenèse, vasogénique (rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE)) ou cytotoxique (prise anormale d'ions), n'a pas encore été déterminée. Il a été démontré que le co-transporteur Na-K-Cl (NKCC1) du côté luminal des microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV) joue un rôle dans le développement de l'œdème cérébral dans des modèles d'ischémie où la bumétanide, un inhibiteur de NKCC, atténue l'œdème cérébral. Deux modèles d'EH ont été utilisés pour cette étude i) la ligature de la voie biliaire (BDL) qui présente l'hyperammoniémie chronique, l'œdème cérébral et le stress oxydatif systémique ; ii) l'anastomose portocave (PCA) qui présente de l'hyperammoniémie chronique seulement. Les buts du projet étaient de: i) définir l'origine du développement de l'œdème chez les rats BDL en étudiant l'extravasation de macromolécules, les jonctions serrées et l'activation des métalloprotéinases matricielles de la BHE; ii) observer les effets de l'hyperammoniémie chronique indépendamment sur la BHE chez les rats PCA; iii) évaluer le rôle de l'hyperammoniémie et du stress oxydatif et iv) étudier le rôle du NKCC1 dans les CMV dans la pathogenèse de l'œdème cérébral. Les résultats du projet démontrent que l'œdème est d'origine cytotoxique chez les rats BDL et que l'intégrité de la BHE est conservée chez les rats PCA malgré l'hyperammoniémie. L'expression génique du NKCC1 est associée à l'œdème mais pas son expression protéique et sa phosphorylation. Enfin, l'étude démontre que l'hyperammoniémie et le stress oxydatif indépendant ne jouent pas un rôle dans la pathogenèse de l'œdème mais suggère qu'ils y aient un effet synergique.

Mots clé : encéphalopathie hépatique minimale, hyperammoniémie, barrière hémato-encéphalique, NKCC1, bumétanide, AST-120, ligature de la voie biliaire, anastomose portocave, œdème cytotoxique.

Abstract

Brain edema is a complication associated with hepatic encephalopathy (HE) due to chronic liver failure (cirrhosis). It is unclear whether brain edema is of vasogenic (blood brain barrier (BBB) breakdown) or cytotoxic (abnormal cellular uptake of ions) origin. It has been demonstrated that the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1) located on the luminal side of the cerebral microvessels (CMV) is implicated in the pathogenesis of brain edema in animal models of ischemia and that the administration of bumetanide, an inhibitor of NKCC, attenuates brain water increase. Two distinct animal models of chronic liver failure and HE are used in the present study; 1) bile duct ligation (BDL) where brain edema, chronic hyperammonemia and systemic oxidative stress are observed; 2) portacaval anastomosis (PCA) where only chronic hyperammonemia is observed. The aims of the study were to: i) determine the origin of brain edema in BDL rats measuring brain extravasation, tight junctions expression and matrix metalloproteinase activation; ii) observe the effects of chronic hyperammonemia on the BBB in PCA rats; iii) study the role of oxidative stress and hyperammonemia; iv) evaluate the role of NKCC in CMV in the pathogenesis of brain edema. The results of the study determined that brain edema in BDL rats is of cytotoxic origin and chronic hyperammonemia independently has no effect on the BBB. An increase of NKCC1 mRNA is associated with brain edema but protein expression and phosphorylation are not. Furthermore, hyperammonemia and oxidative stress independently are not implicated in the development of brain edema however a synergistic effect between the two pathogenic factors in BDL rats remains a possibility.

Key words: minimal hepatic encephalopathy, hyperammonemia, blood brain barrier, NKCC1, bumetanide, AST-120, bile duct ligation, portacaval anastomosis, cytotoxic edema

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Listes des tableaux</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvi</i>
 <i>Introduction</i>	 <i>1</i>
 <i>1. Encéphalopathie hépatique</i>	 <i>1</i>
Définition.....	1
Organes impliqués dans l'encéphalopathie hépatique	1
Le système nerveux central	2
Le cerveau.....	3
Cortex préfrontal	3
Cellules du cerveau	4
Le foie.....	5
Le cycle d'urée.....	5
La vésicule biliaire.....	7
La cirrhose du foie	7
Types d'EH	8

Caractéristiques de l'encéphalopathie hépatique minimale	10
Détermination de la sévérité et diagnostic de l'EH.....	11
Pathogenèse de l'EH.....	13
Ammoniac	14
Propriétés de l'ammoniac	15
Entrée du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans le SNC	16
Toxicité de l'ammoniac	16
Traitement de l'EH	18
<i>2. Stress oxydatif.....</i>	<i>19</i>
Radicaux libres oxygénés	19
Rôle des radicaux libres oxygénés dans la signalisation cellulaire	20
Conséquences négatives du stress oxydatif	21
<i>3. Œdème cérébral</i>	<i>23</i>
Définition.....	23
Types d'œdème cérébral.....	23
Œdème cérébral dans une insuffisance hépatique aiguë.....	24
Œdème cérébral dans une insuffisance hépatique chronique.....	25
<i>4. Barrière hémato-encéphalique.....</i>	<i>26</i>
Cellules endothéliales	27
Astrocytes.....	28
Neurones.....	29
Péricytes	29
Jonctions de la BHE	29
Occludine.....	31
Claudine-5	32
ZO-1 et ZO-2	32
Molécules d'adhésion jonctionnelle.....	34
Matrice extracellulaire	35
Métalloprotéinases matricielles	35
<i>5. Le co-transporteur Na-K-Cl</i>	<i>36</i>
Fonctions et structure.....	37
Rôle dans le développement de l'œdème cérébral	38
Régulation du NKCC1	39

6. Modèle animaux d'EH	42
Ligature de la voie biliaire (BDL)	42
Anastomose portocave (PCA).....	45
7. But du projet	47
<i>Matériel et méthodes.....</i>	48
1. Modèles expérimentaux.....	48
Ligature de la voie biliaire (<i>bile duct ligation</i> (BDL)).....	48
Anastomose portocave (<i>portocaval anastomosis</i> (PCA)).....	48
2. Traitement chez les rats <i>BDL</i>	49
Traitement avec la bumétanide et l'AST-120	49
Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à l'Evans Blue et à la fluorescéine de sodium.....	49
3. Étude de la barrière hémato-encéphalique	50
Détermination des niveaux d'EB et de NaF	50
Détermination de l'œdème cérébral.....	51
Détermination des niveaux d'ammoniaque.....	51
Quantification des niveaux de radicaux libres oxygénés dans le plasma	51
Préparation des lysats de cortex préfrontal	52
Isolement des microvaisseaux sanguins cérébraux.....	52
Immunobuvardage	53
Évaluation de la carbonylation des chaînes latérales des protéines	54
Détermination de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP).....	54
Extraction d'acide ribonucléique (ARN).....	55
Transcription Inverse-Amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR).....	55
Analyse statistique	56

***Résultats* 57**

***1. Intégrité de la BHE*..... 57**

Expérience 1 : extravasation d'Evans Blue et de fluorescéine de sodium	57
Expérience 2a : expression des protéines transmembranaires des JS	59
Expérience 2b : expression des protéines d'échafaudages des JS	62
Expérience 3 : activité de MMP-9 et MMP-2.....	65

2. Rôle du NKCC1 dans la pathogenèse de l'œdème

***cérébral* 67**

Traitement avec la bumétanide et œdème cérébral.....	68
Isolement des microvaisseaux sanguins cérébraux.....	69
Expression de l'ARNm du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL.....	70
Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats PCA.....	72
Traitement avec l'AST-120 et expression de l'ARNm codant pour le NKCC1	74
Traitement avec BUM et expression d'ARNm codant pour le NKCC1	77
Expression protéique du NKCC1.....	78
Phosphorylation du NKCC1.....	80

***3. Rôle du NH₃ dans l'œdème cérébral* 83**

Le niveau du NH ₃ plasmatique lors d'un traitement avec la BUM.....	83
--	----

***4. Le stress oxydatif chez les rats BDL*..... 85**

Le niveau des radicaux libres oxygénés dans le plasma après un traitement avec de la BUM.....	85
Carbonylation des protéines	86

***Discussion* 90**

1. Origine de l'œdème cérébral chez les rats BDL..... 92

L'œdème chez les patients cirrhotiques	92
L'intégrité de la BHE dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale	93
L'intégrité des jonctions serrées dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale	95
Les métalloprotéinases matricielles dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale.....	97
Effets de l'hyperammoniémie chronique chez les PCA sur la BHE.....	98
Rôle de l'œdème dans l'EH.....	99
Insuffisance hépatique aiguë.....	99
Insuffisance hépatique chronique	100

2. Le NKCC1 et l'œdème chez les rats BDL..... 101

La bumétanide (inhibiteur du NKCC)	101
Doses et nature du traitement de la bumétanide	101
Effet de BUM dans les reins	103
Les reins et le métabolisme du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	103
La BUM et NKCC2	103

3. Expression génique du NKCC1 et l'œdème chez les rats BDL..... 105

Transcription génique du NKCC1	105
Effet de l'AST-120 et de la BUM sur l'ARNm du NKCC1.....	105
Mécanisme de régulation de l'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL	106

4. Expression protéique du NKCC1 et œdème chez les rats BDL..... 108

Implication du NKCC1 dans l'œdème.....	108
Rôle du NKCC1 dans transport de NH_4^+	109
Le NKCC1 et l'œdème cérébral chez les rats BDL.....	109
Corrélation entre l'expression génique et protéique du NKCC1	111

5. Stress oxydatif dans la pathogenèse de l'œdème cérébral.	112
Stress oxydatif chez les rats BDL	112
Implication du stress oxydatif	112
Carbonylation	113
6. Études futures.....	115
Microvaisseaux sanguins cérébraux	115
NKCC1	115
Thérapies pour l'EH	116
Hyperammoniémie et stress oxydatif	116
7. Résumé de l'étude.....	117
Références.....	119

Listes des tableaux

Tableau 1. Classification clinique de l'encéphalopathie hépatique	9
Tableau 2. Critères de West Haven modifiés	12

Liste des figures

Figure 1. Régions du système nerveux central	3
Figure 2. Lobes des hémisphères cérébraux	4
Figure 3. Le foie et sa vascularisation	6
Figure 4. Le cycle d'urée dans le foie	7
Figure 5. Les trois sous-catégories d'EH de type C	10
Figure 6. Pathogenèse de l'EH	14
Figure 7. Exemples de rôles de l'ammoniaque (NH_4^+) dans des réactions biochimiques	16
Figure 8. Cycle glutamate/glutamine.....	18
Figure 9. ROS dans la signalisation cellulaire	21
Figure 10. Dérivation du groupe carbonyle des chaînes latérales des protéines	22
Figure 11. Oedème vasogénique et œdème cytotoxique.....	24
Figure 12. Composantes de l'unité neurovasculaire	27
Figure 13. Protéines des jonctions serrées	31
Figure 14. Claudine-5 et ZO5	34
Figure 15. Structure du NKCC1	38
Figure 16. Régulation du NKCC1 dans les cellules endothéliales	41
Figure 17. Ligature de la voie biliaire (BDL)	43
Figure 18. Caractéristiques du modèle BDL	44

Figure 19. Anastomose portocave (PCA).....	45
Figure 20. Caractéristique du modèle PCA.....	46
Figure 21. Extravasation d'EB et de NaF dans le cortex cérébral des rats BDL et PCA	59
Figure 22. L'expression relative de la protéine membranaire intégrale claudine-5 chez les rats BDL et PCA dans le cortex préfrontal	61
Figure 23. L'expression relative de la protéine membranaire intégrale occludine chez les rats BDL et PCA dans le cortex préfrontal	62
Figure 24. L'expression relative de la protéine cytoplasmique ZO-1 chez les rats BDL et les rats PCA dans le cortex préfrontal.....	64
Figure 25. L'expression relative de la protéine cytoplasmique ZO-2 chez les rats BDL et les rats PCA dans le cortex préfrontal.....	65
Figure 26. L'activité enzymatique des MMP dans le cortex préfrontal chez les rats BDL et les rats PCA	66
Figure 27. Quantité d'eau dans le cortex cérébral chez les rats BDL et les rats BDL traités avec de la BUM.....	69
Figure 28. Les microvaisseaux sanguins cérébraux isolés à partir d'un protocole de centrifugation	70
Figure 29. Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux cérébraux chez les rats BDL	72
Figure 30. Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux cérébraux chez les rats PCA	74
Figure 31. Effet de l'administration de l'AST-120 sur l'expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux	76

Figure 32. L'expression génique du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux des rats BDL lors d'une administration de BUM	78
Figure 33. Le niveau d'expression protéique du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL et les rats PCA	80
Figure 34. La phosphorylation du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL	82
Figure 35. Les concentrations d'ammoniaque (NH_4^+) dans le plasma artériel chez les rats BDL et les rats BDL traités avec de la BUM.....	84
Figure 36. Le niveau des radicaux libres oxygénés dans le plasma artériel chez les rats BDL traités avec la bumetanide	86
Figure 37 La carbonylation de chaînes latérales des protéines des microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL.....	88
Figure 38. Résumé des résultats du projet.....	91
Figure 39. Résumé des conclusions de l'étude	118

Liste des abréviations

BDL: *bile duct ligation*/ligature de la voie biliaire

BHE: Barrière hémato-encéphalique

BUM : bumetanide

CMV : *cerebral microvessel*/microvaisseaux sanguins cérébraux

DNPH : 2,4-dinitrophénol hydrazine

DNP : Dinitrophénol

EB : Evans blue

EH : Encéphalopathie hépatique

JS : jonction serrée

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MMP : *matrix metalloproteinase*/métalloprotéinase matricielle

NaF : *sodium fluoresceine*/fluorescéine de sodium

NKCC1 : *Na-K-Cl- cotransporteur 1*/co-transporteur Na-K-Cl 1

PCA: *portocaval anastomosis*/anastomose portocave

ROS : *reactive oxygen species*/espèces réactives oxygénées

SHAM : simulacre

SNC : système nerveux central

WNK : *With no Lysine kinase*/ kinase sans lysine

ZO : zonula occludens

Remerciements

D'abord, j'aimerais remercier mon superviseur, **Dr. Christopher Rose** et **Mélanie Tremblay** pour le succès de mon projet et pour leur soutien lors de la rédaction de mon mémoire.

Ensuite, je tiens à souligner travail avec les animaux de **Cristina Bosoi** et de **Christian Parent-Robitaille** qui a grandement contribué à mon projet.

Enfin, je voudrais aussi remercier mes amis Giang Nguyen, Minh Phu Nguyen, Azzea Huynh, Duc Duy Nguyen, Minh Van Ngo, Vanessa Wacleche, Élodie Roberge et finalement, mes parents.

Introduction

1. Encéphalopathie hépatique

Définition

L'encéphalopathie hépatique (EH) est une manifestation importante de symptômes neuropsychiatriques associés à une insuffisance hépatique aiguë et chronique. Dans l'insuffisance hépatique aiguë, l'EH définit un pronostic dans lequel les symptômes neuropsychiatriques sont détectables cliniquement et où environ 30% des patients succombent à un œdème cérébral et une pression intracrânienne sévère (Shawcross et al., 2005). Dans l'insuffisance hépatique chronique (une cirrhose du foie), des symptômes neuropsychiatriques variables sont présents. Or, lors d'une cirrhose du foie, il y a deux types d'EH : minimale et manifeste. L'EH minimale présente des déficiences cognitives subtiles qui ne sont pas détectables cliniquement et sont diagnostiqués seulement à l'aide de tests neuropsychologiques. Dans l'EH manifeste, ils sont variables et cliniquement évidents et similaires à ceux d'une insuffisance hépatique aiguë : de la psychose, des tremblements, de l'ataxie et le coma. Environ 60% à 80% des patients cirrhotiques développent l'EH minimale et les risques de présenter l'EH manifeste augmentent de 60% (Bajaj, 2010). L'EH minimale a un impact négatif sur la qualité de vie des patients et son fardeau économique sur les patients, la famille et la société est considérable. Présentement, le meilleur traitement pour l'EH est la transplantation du foie, une solution toutefois difficilement envisageable pour l'ensemble des patients à cause de la faible disponibilité des organes.

Organes impliqués dans l'encéphalopathie hépatique

Les deux organes impliqués dans la pathogenèse de l'EH sont le cerveau et le foie. Le fonctionnement normal du cerveau dépend des fonctions hépatiques. Par

exemple, le foie permet l'élimination efficace de l'ammoniac (NH_3). Lors d'insuffisance hépatique, cette capacité est amoindrie et entraîne une accumulation nocive du NH_3 dans le système sanguin, et éventuellement, dans le cerveau (Moriwaki et al., 2010).

Le système nerveux central

Notre étude s'intéresse à trois régions du système nerveux central (SNC) en particulier (**Figure 1**). La moelle épinière est la région la plus caudale du système nerveux central et reçoit les informations sensorielles du reste du corps. Le tronc cérébral lie la moelle épinière au cerveau. Il est un centre nerveux régulant l'attention et recevant les informations sensorielles de la peau et des muscles du visage. Il est composé de trois parties importantes : le mésencéphale qui régule les fonctions sensorielles et motrices (mouvement des yeux, coordination des réflexes visuels et auditifs), les pons qui transmettent les informations des mouvements des hémisphères cérébraux au cervelet et la médulla oblongata qui régule les fonctions autonomiques (battements de cœur, digestion, respiration). Le cervelet régule la force et la portée des mouvements. Le cerveau est l'organe principal du SNC. Il est divisé en deux hémisphères cérébraux, il régule les autres organes du système et il est le responsable des fonctions cognitives complexes.

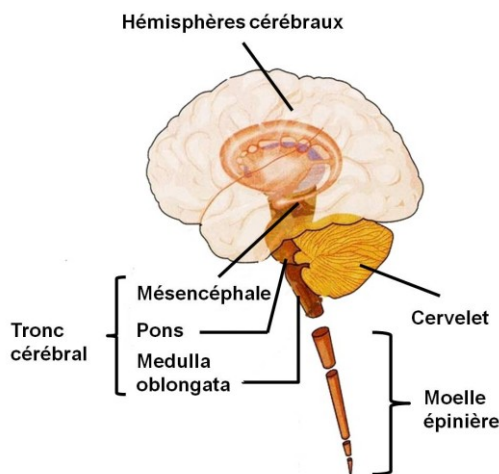


Figure 1. Régions du système nerveux central

Situé en dessous du cerveau, le tronc cérébral lie la moelle épinière au cerveau et inclut le mésencéphale, les pons et la médulla oblongata. Au dessus du tronc cérébral, le cervelet régule la force et la portée des mouvements. Le cerveau est divisé en deux hémisphères cérébraux et il est l'organe principal du SNC (Image importée et modifiée de Kandel et al. (2000))

Le cerveau

Les deux hémisphères du cerveau sont divisés en quatre lobes : frontal, pariétal, temporal et occipital (**Figure 2**). Le lobe frontal régit principalement la planification des actions et le contrôle des mouvements. Le lobe pariétal s'occupe essentiellement de la sensation somatique. Le lobe temporal, composé de l'hippocampe et des noyaux amygdaloïdes, est important pour l'audition, le langage, la mémoire et l'émotion. Enfin, le lobe occipital est le centre visuel du cerveau. Le cerveau est alimenté en sang par des microvaisseaux sanguins formant la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière est une barrière de diffusion qui sépare la circulation sanguine du SNC afin de le protéger (Widmaier et al., 2006).

Cortex préfrontal

Situé dans la partie la plus rostrale du lobe frontal, le cortex préfrontal est une des régions les plus élaborées chez les primates et les humains. Il est le siège de différentes fonctions cognitives supérieures notamment la planification des actions, le comportement et le raisonnement. Cela s'explique par sa multitude d'interneurones qui

reçoivent et envoient des projections de, et vers, virtuellement toutes les régions du cortex (Miller et al., 2001).

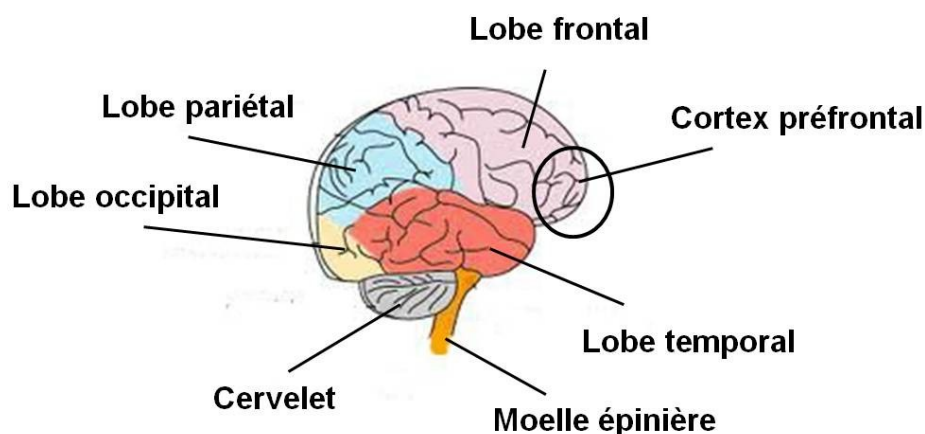


Figure 2. Lobes des hémisphères cérébraux

Le lobe frontal (mauve), le lobe pariétal (bleu), le lobe occipital (beige) et le lobe temporal (rouge) sont les régions majeures des hémisphères cérébraux. Le cortex préfrontal est la partie antérieure du lobe frontal. (Image importée et modifiée de <http://aksels.novaz.com/lsn.php>)

Cellules du cerveau

Les neurones et les cellules gliales sont les cellules importantes du cerveau, et sont alimentées en sang par les microvaisseaux sanguins cérébraux (*cerebral microvessels* (CMV)). Les neurones sont des cellules excitables qui forment l'unité fondamentale du SNC. De plus, il y a trois types de cellules gliales : les épendymocytes, les microglies et les macroglies. Les épendymocytes sont responsables de la synthèse du liquide céphalo-rachidien (LCR). Les microglies ont des fonctions similaires aux macrophages : ils s'occupent de la phagocytose de débris et cellules mortes. Dans le SNC, les oligodendrocytes qui forment la myéline enveloppant les axones des neurones et les astrocytes, des cellules jouant un rôle important dans la régulation du SNC, composent les macroglies (Widmaier, 2006).

Astrocytes

Dans le SNC, les astrocytes sont des cellules gliales en forme d'étoile. Elles occupent d'importantes fonctions comme la régulation de neurotransmetteurs et d'ions, la production de facteurs trophiques et le métabolisme du glucose (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011). De plus, ce sont les cellules cérébrales qui ont la plus grande activité en glutamine synthétase, une enzyme qui convertit le glutamate et le NH_3 en glutamine (Tansey et al., 1991).

Le foie

Le deuxième organe impliqué dans l'EH est le foie. Situé dans la cavité abdominale, en dessous du diaphragme, le foie est un organe vital de couleur rouge-brune dont les lobes sont de formes et de tailles différentes. Il est alimenté en sang provenant des intestins par la veine porte et en sang oxygéné par l'artère hépatique (**Figure 3**). Les cellules composant le foie sont appelées des hépatocytes. Ces cellules sont des actrices importantes dans plusieurs fonctions essentielles comme la gluconéogenèse, le métabolisme des lipides, la production d'hormones, la synthèse de protéines plasmatiques, la production de facteurs de coagulation, la détoxification de médicaments, la production de la bile et la détoxification du NH_3 par le cycle d'urée.

Le cycle d'urée

Le cycle d'urée permet de convertir l'excès d'azote sous forme d'ammoniac (NH_3) en un produit moins toxique : l'urée. Comme montré à la **Figure 4**, l'urée est synthétisée par les enzymes du cycle d'urée dans les hépatocytes. Elle est alors sécrétée dans la circulation sanguine et excrétée par les reins. En résumé, la première réaction est la conversion du NH_3 , HCO_3^- et d'ATP en carbomyl phosphate par la synthétase de carbomyl phosphate dans la mitochondrie. Dans le cytosol, le carbomyl phosphate sera converti par réactions enzymatiques successives pour produire de l'urée. L'urée possède deux atomes d'azote. Le premier vient du NH_3 dans la réaction initiale dans la mitochondrie tandis que le deuxième NH_3 provient de l'aspartate (Widmaier, 2006).

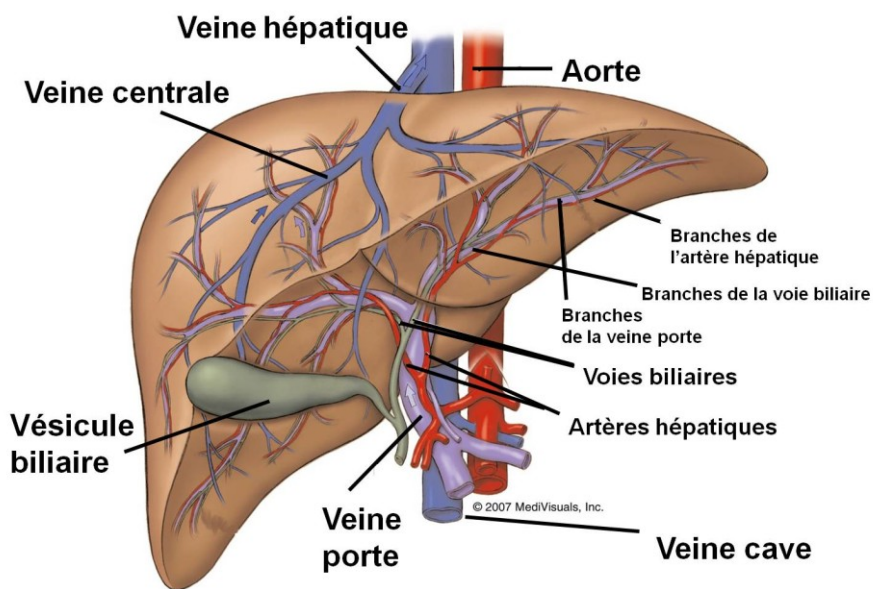


Figure 3. Le foie et sa vascularisation

La veine porte amène le sang veineux des intestins au foie et les artères hépatiques amène le sang artériel de l'aorte au foie. Le sang veineux du foie est retourné dans la circulation systémique par la veine hépatique à la veine cave (Image importée et modifiée de <http://www.arizonatransplant.com/healthtopics/liver.html>).

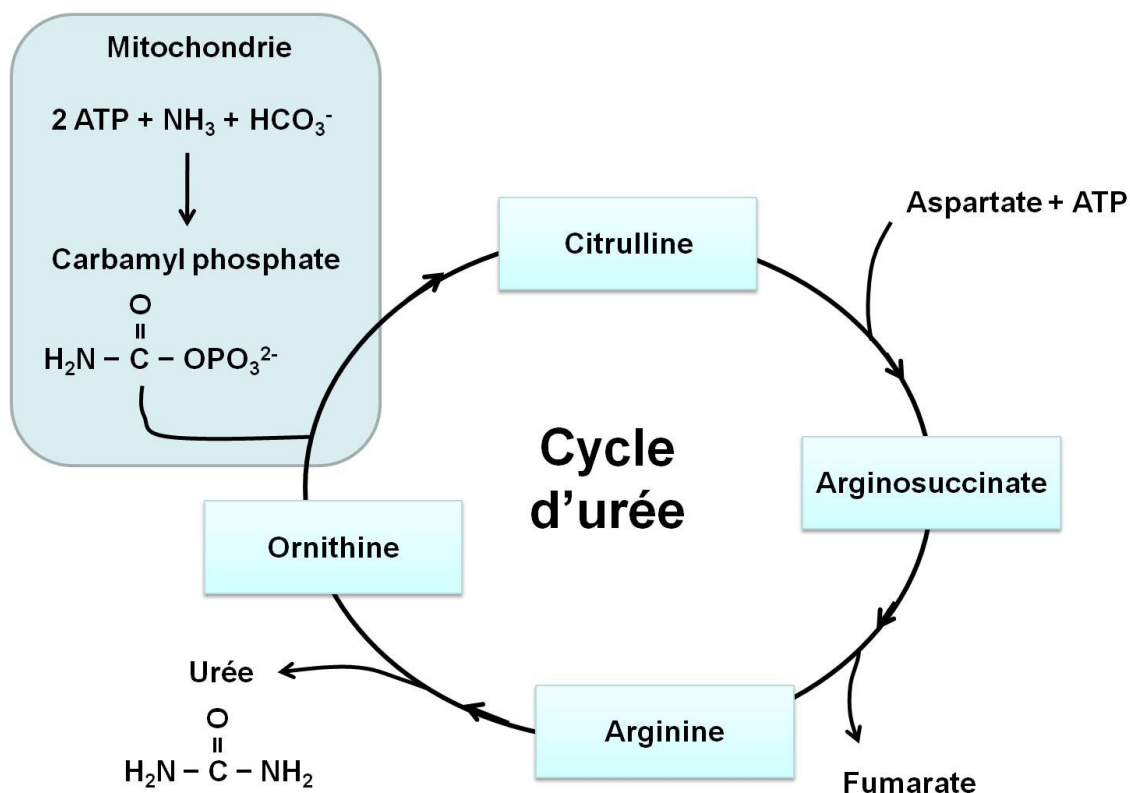


Figure 4. Le cycle d'urée dans le foie

Dans la mitochondrie, la molécule du NH_3 est converti en carbamyl phosphate. Ce substrat est exporté dans le cytosol et il est converti par des réactions enzymatiques successives en urée.

La vésicule biliaire

Chez les humains, la bile est un fluide alcalin qui est produit par les hépatocytes. Elle est composée de d'eau, d'ions, de cholestérol, de pigments, de sels et d'acides biliaires. Lorsqu'elle ne sert pas à la digestion immédiate, elle est emmagasinée dans la vésicule biliaire située en dessous du foie. Cet organe concentre la bile pour la relâcher dans le canal cystique qui mène au canal cholédoque vers le duodénum lors de la digestion pour métaboliser les lipides (Widmaier, 2006).

La cirrhose du foie

La cirrhose du foie est une maladie hépatique chronique. Elle est définie comme un développement de nodules régénératifs entourés de bandes fibreuses où l'architecture hépatique est endommagée (Schuppan et al., 2008). La cause majeure de la cirrhose du

foie est une consommation abusive d'alcool. Elle est suivie par les infections virales (hépatite C), de maladies auto-immunes variées, d'hémochromatose et la stéato-hépatie non alcoolique (Haukeland et al., 2007). Ainsi, ces nodules dans le foie sont le résultat d'une agression constante aux hépatocytes ce qui provoque une cicatrisation continue des tissus hépatiques, endommageant la structure du foie et désorganisant sa vasculature. En conséquence, la fibrose gêne la circulation sanguine et mène à une hypertension portale, augmentant la pression dans les veines de l'intestin lui amenant le sang et conduisant à un saignement intra-gastro-intestinal. L'hypertension cause aussi la formation de collatérales portosystémiques (développement de veines) qui détournent le sang de la veine porte vers la circulation systémique (Tarantino et al., 2009). Bref, la cirrhose du foie conduit à une lente perte des fonctions hépatiques. Pour diagnostiquer l'état du foie, les niveaux sériques de transaminase d'alanine (ALT) et de l'aminotransférase d'aspartate (AST) sont analysés. Physiologiquement, ces deux enzymes métabolisant les acides aminés sont retrouvées en grande quantité dans le foie et en faible quantité dans le sang. Lors d'une cirrhose du foie, les hépatocytes endommagés relâchent ces enzymes dans le sang, servant de marqueurs pour les maladies du foie (Giboney, 2005).

Types d'EH

En 1998, à Vienne, l'Organisation Mondiale de Gastroentérologie a accepté une nomenclature pour classifier l'EH en trois types (Ferenci et al., 2002). Ils sont présentés au **Tableau 1**. L'EH de type A est causée par une insuffisance hépatique aiguë. Cette insuffisance peut provenir d'une infection virale, d'une consommation aiguë de drogue hépatotoxique ou d'une ingestion d'autres hépatotoxines. Cela cause un arrêt brusque et total des fonctions hépatiques. L'EH de type B est associée à une déviation portosystémique (*bypass*) par chirurgie sans endommagement intrinsèque de l'organe. En bref, le sang de la veine porte est dévié par chirurgie dans la circulation sanguine. Subséquemment, le sang veineux provenant directement des intestins n'est plus filtré par celui-ci. Cet effet secondaire survient lors d'une chirurgie pour diminuer une

hypertension portale due à la cirrhose ou une obstruction de la circulation portale. L'EH de type C est associée à une cirrhose du foie.

Le type C est divisé en trois sous-catégories : épisodique, persistante et minimale (**Figure 5**). Premièrement, l'EH épisodique représente des épisodes d'apparition de symptômes détectables en clinique, causés par des facteurs précipitants (hyperammonémie aiguë, stress oxydatif, inflammation, etc.) chez les patients cirrhotiques. Deuxièmement, une EH est classée persistante lorsque les symptômes sont présents en permanence. Enfin, l'EH minimale est caractérisée par de subtils déficits neurologiques détectés par des tests neuropsychométriques sans manifestation de symptômes sévères détectables cliniquement.

Tableau 1. Classification clinique de l'encéphalopathie hépatique		
Types d'EH	Nomenclature	Sous-catégorie
A	Associée à une insuffisance hépatique aiguë	
B	Associée à une déviation porto systémique par chirurgie sans dommage intrinsèque du foie	
C	Associée à une cirrhose du foie	A) Épisodique B) Persistante C) Minimale

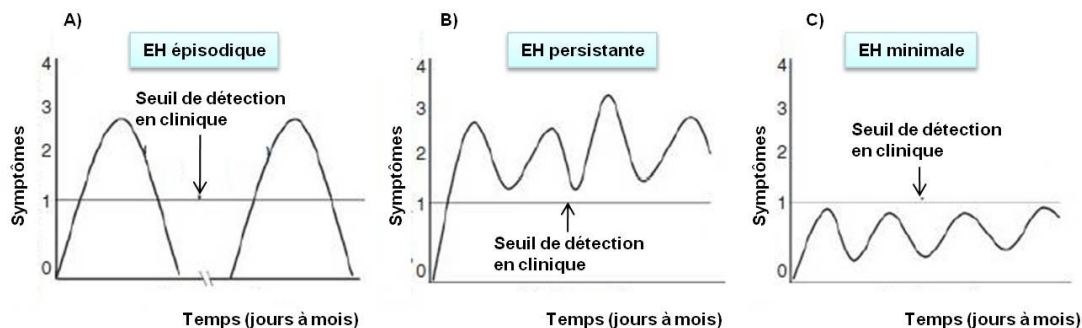


Figure 5. Les trois sous-catégories d'EH de type C

A) Dans l'EH épisodique, les symptômes apparaissent sporadiquement. B) Dans l'EH persistante les symptômes sont toujours présents. C) Dans l'EH minimale, les symptômes ne sont pas détectables cliniquement (Image importée et modifiée de Bajaj (2010)).

Caractéristiques de l'encéphalopathie hépatique minimale

Il est important de faire la différence entre l'EH minimale et l'EH manifeste. L'EH minimale est une diminution subtile des fonctions neurocognitives tandis que l'EH manifeste présente des symptômes variables et cliniquement évidents tels que la confusion, la psychose, la stupeur, le changement de personnalité, les troubles moteurs et un coma (Randolph et al., 2009). L'EH minimale survient chez approximativement 60 à 80% des patients cirrhotiques (Bajaj, 2010).

Malgré le fait que les changements dans les fonctions cognitives soient subtiles, l'EH minimale diminue la qualité de vie des patients. Les activités simples ne sont pas affectées mais ce sont plutôt les activités complexes telles que la conduite d'une voiture et les tâches quotidiennes au travail qui sont perturbées (Stewart et al., 2007). Une étude a confirmé ce fait à l'aide d'un questionnaire sur les habitudes de vie (Prasad et al., 2007). Une autre étude a démontré que l'habileté de la conduite d'une voiture par des sujets atteints d'EH minimale était affaiblie (Bajaj et al., 2008). La diminution de l'attention et de la dextérité peuvent expliquer pourquoi la sécurité des patients au volant est réduite (McCrea et al., 1996). En contrepartie, la communication verbal est relativement épargnée chez les patients cirrhotiques (Weissenborn et al., 2003). Donc, ce ne sont pas toutes les fonctions cognitives qui sont affectées. Finalement, les patients

cirrhotiques avec l'EH minimale ont plus de risque de développer des symptômes sévères. Trois années après le dépistage, les risques de développer l'EH étaient de 56% pour les patients avec l'EH minimale contre 8% pour ceux sans EH minimale (Hartmann et al., 2000). Enfin, des études ont démontré que l'EH minimale réduit les chances de survie des patients cirrhotiques (Stewart, 2007) et prolonge leur séjour à l'hôpital (Mumtaz et al., 2010). Alors, il est important de diagnostiquer l'EH minimale afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

Détermination de la sévérité et diagnostic de l'EH

Il est nécessaire pour le médecin de diagnostiquer la présence d'insuffisance hépatique et d'éliminer la présence de toute autre condition, par exemple, l'encéphalopathie de Wernicke, qui pourrait causer des symptômes neurologiques similaires à l'EH. Les symptômes de l'EH sont gradés selon les critères de West Haven au **Tableau 2** (Ferenci, 2002).

Tableau 2. Critères de West Haven modifiés	
Stage	Symptômes détectables en clinique
0 (minimale)	Aucun symptôme détectable en clinique. Axtérixis absent. Déficiences cognitives subtiles détectables à l'aide de tests neuropsychométriques.
1	Manque d'attention, hypersomnie ou insomnie. Dépression ou euphorie. Difficulté dans l'arithmétique élémentaire. Axtérixis détectable.
2	Léthargie ou apathie. Désorientation. Comportement inapproprié. Troubles d'élocution. Astérixis évident.
3	Désorientation générale. Comportement bizarre. Confusion. Stupeur.
4	Coma pouvant mener à la mort.

La détection de l'EH minimale chez les patients cirrhotiques se fait à partir de tests neuropsychométriques qui identifient les déficiences cognitives subtiles (Sharma, 2009; Weissenborn et al., 2001). Les examens neurophysiologiques représentent une autre possibilité d'identifier l'EH minimale. Ils consistent à étudier l'activité électrique du cortex. Par exemple, l'électroencéphalogramme mesure l'activité électrique cérébrale à l'aide d'électrodes placées sur le cuir chevelu (Niedermeyer et al., 2005). À l'aide de cette technique, des études démontrent que l'activité électrique cérébrale diffère chez les patients atteints d'EH minimale (Guerit et al., 2009; Kullmann et al., 1995). L'étude du cerveau des individus cirrhotiques par imagerie médicale est complémentaire aux résultats des tests neuropsychométriques et neurophysiologiques. Une étude d'imagerie en résonance magnétique a indiqué que le globus pallidus des patients cirrhotiques

émettait un signal différent des patients sains qui était dû à l'accumulation de manganèse (Rose et al., 1999a).

En résumé, le diagnostic de l'EH se fait à partir des symptômes d'une insuffisance hépatique et la sévérité est gradée selon les critères de West Haven. Le diagnostic de l'EH minimale est plus complexe parce que cette condition ne présente pas de symptômes évidents mais plutôt des changements subtils des fonctions cognitives. Ainsi, les tests neuropsychométriques et neurophysiologiques sont nécessaires pour sa détection et l'imagerie médicale peut être incorporée à ceux-ci pour un meilleur diagnostic.

Pathogenèse de l'EH

Le mécanisme de la pathogenèse de l'EH n'a pas encore été complètement élucidé. Il y a trois possibilités vraisemblables qui sont résumées à la **Figure 6**. La première possibilité est la production de facteurs endogènes pathogéniques par le foie endommagé. Dans la cirrhose du foie, des facteurs d'inflammation et la libération de radicaux libres oxygénés (ROS) seraient des bons exemples. La deuxième possibilité est la diminution de production par le foie de facteurs essentiels au bon fonctionnement du corps. La production de protéines plasmatiques, de facteurs de coagulation, de lipides et la gluconéogenèse en sont de bons exemples. La troisième hypothèse est la réduction de la capacité du foie à éliminer des substances neurotoxiques endogènes ou exogènes. Ce dernier postulat est le concept le mieux accepté (Moriwaki, 2010). La majorité de ces neurotoxines proviennent de la flore bactérienne des intestins (Riordan et al., 2010) et elles sont absorbées par les intestins et elles sont par la suite transportées vers la veine porte hépatique pour aller au foie (Mousseau et al., 1994). Ces substances neurotoxiques dont l'ammoniac/ammoniaque ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) ne sont plus éliminées à cause de l'insuffisance hépatique. Alors, leur concentration augmente dans le système sanguin. Elles peuvent éventuellement atteindre la BHE, la traverser, s'accumuler et compromettre le SNC. D'autres molécules provenant des intestins telles que le

manganèse, le fer, le cuivre, le phénol, le mercaptan et les benzodiazépines pourraient contribuer à la pathogénèse de l'EH (Riordan et al., 1997).

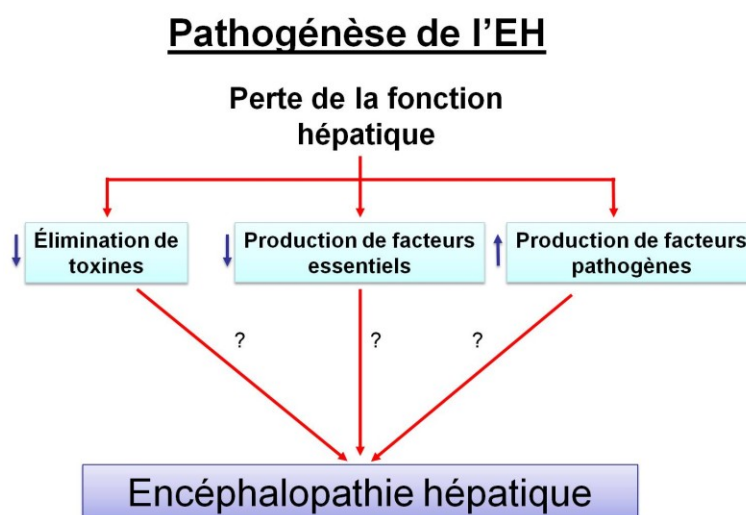


Figure 6. Pathogénèse de l'EH

Voici trois façons plausibles qu'une insuffisance hépatique puisse affecter le SNC. Il y a la réduction de la capacité à éliminer les neurotoxines, la réduction de la capacité à produire des facteurs essentiels et l'augmentation de la production de facteurs néfastes.

Ammoniac

Plusieurs recherches appuient la théorie que les niveaux d'ammoniac/ammoniaque ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) corrélerent avec la sévérité de l'EH chez les patients cirrhotiques (Lockwood, 2004; Nicolao et al., 2003; Ong et al., 2003). Il serait la neurotoxine principale impliquée dans la pathogénèse de l'EH. Chez les patients avec une insuffisance hépatique, le NH_3 n'est plus éliminé efficacement par le cycle d'urée dans le foie. Sa concentration augmente alors dans le sang. Cette condition est l'hyperammoniémie. Le NH_3 atteint alors le cerveau et s'accumule. La source majeure de production du NH_3 est dans les intestins. Dans cet organe, le NH_3 peut être produit par le métabolisme et la déamination des protéines. Par exemple, une enzyme, la glutaminase, retrouvée entre autres dans les cellules musculaires et les astrocytes, métabolise la glutamine et produit du glutamate et le NH_3 (**Figure 7**). Les bactéries

exprimant l'uréase, qui métabolise l'urée en NH_3 , contribuent à l'hyperammoniémie (Wright et al., 2007a). Lors d'une cirrhose du foie, les muscles deviennent un éliminateur important du NH_3 par l'action de la glutamine synthétase qui forme de la glutamine avec une molécule de glutamate et du NH_3 (Desjardins et al., 1999). Malheureusement, les muscles des patients cirrhotiques tendent à être atrophiés et cela réduit leur capacité à éliminer l'ammoniac (Stewart, 2007). Dans le SNC, le NH_3 peut être converti en glutamine par la glutamine synthétase dans les astrocytes (Tansey, 1991).

Propriétés de l'ammoniac

Le NH_3 est une molécule qui peut agir comme un acide faible (ammoniaque, NH_4^+) ou une base faible (ammoniac, NH_3) dont le pKa est de 9.25 (Bosoi et al., 2009). Le NH_3 est très soluble dans l'eau mais moins soluble dans les lipides. L'équation d'équilibre de l'ammoniac est $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$. Le ratio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ s'équilibre en fonction du pH et est défini par l'équation de Henderson-Hasselback :

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

Ainsi, dans des conditions physiologiques à un pH de 7.4, 98% de l'ammoniac est sous forme NH_4^+ . La forme gazeuse du NH_3 peut diffuser à travers les cellules tandis que la forme ionique NH_4^+ peut être transportée par les canaux ioniques ou les transporteurs d'ions à travers la membrane cellulaire. En effet, l'ion NH_4^+ est très similaire au potassium (K^+) : rayon ionique et coefficient de diffusion similaire. NH_4^+ peut suivre le gradient de K^+ et peut ainsi avoir un impact sur l'homéostasie ionique du K^+ (Marcaggi et al., 2001). Alors en substituant le K^+ , NH_4^+ peut être transporté par les canaux ioniques de potassium, les transporteurs membranaires comme le co-transporteur Na-K-Cl et la Na^+/K^+ ATPase. Dans les reins, le NH_3 et la NH_4^+ peuvent être excrétés par des transporteurs d'ammoniaque comme les glycoprotéines rhésus (Weiner et al., 2011). Cette protéine est aussi présente dans le SNC (Huang et al., 2009). $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ est aussi un produit ou un substrat dans plusieurs réactions biochimiques impliquant les acides aminés (**Figure 7**).

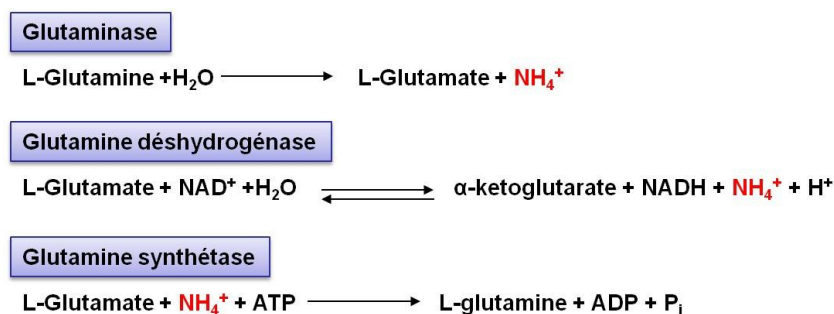


Figure 7. Exemples de rôles de l'ammoniaque (NH_4^+) dans des réactions biochimiques

L'ammoniaque est un substrat utilisé par les enzymes ou un produit des enzymes (encadrées en bleu) dans plusieurs réactions biochimiques de la cellule.

Entrée du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans le SNC

Le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ doit traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le SNC puisque celle-ci sépare le cerveau du reste du corps. Le NH_3 peut diffuser à travers les membranes cellulaires et entrer dans la cellule. Grâce à cette propriété, la concentration intracellulaire du NH_3 ($[\text{NH}_3]_i$) va s'équilibrer avec la concentration extracellulaire du NH_3 ($[\text{NH}_3]_e$). Cependant, la NH_4^+ dans le milieu extracellulaire continue d'entrer dans la cellule par les canaux ioniques ou les transporteurs et produire du NH_3 en libérant son ion H^+ . Cela va augmenter la $[\text{NH}_3]_i$ et alors favoriser l'efflux du NH_3 jusqu'à ce que les $[\text{NH}_3]_i$ et $[\text{NH}_3]_e$ s'équilibrent de nouveau. L'entrée continue du NH_4^+ perpétue le cycle (Marcaggi, 2001).

Toxicité de l'ammoniac

La toxicité du NH_3 pour les cellules est évidente. Lors d'un traitement avec de hautes concentrations du NH_4^+ (1-5 mM), le volume intracellulaire des astrocytes augmente *in vitro* (Jayakumar et al., 2010). Le mécanisme d'action de cette augmentation reste encore nébuleux. Une hypothèse est que le NH_3 altère le système des neurotransmetteurs. L'hyperammoniémie favorise l'entrée du NH_3 dans le SNC. Les astrocytes capturent ces molécules et leur glutamine synthétase le convertit en glutamine. L'hyperammoniémie sature cette enzyme et favorise la conversion le glutamate et le NH_3 en glutamine. L'accumulation de glutamine peut perturber le cycle

glutamate/glutamine (**Figure 8**) entre les neurones et les astrocytes (Bak et al., 2006; Butterworth et al., 1987). Chez les patients, une haute concentration du NH_3 corrèle avec une augmentation de la pression intracrânienne et elle est associée à l'augmentation du niveau de glutamate dans le cerveau (Tofteng et al., 2005). Une concentration de 5 mM du NH_4^+ peut causer une relâche excessive de glutamate, *in vitro*, par les astrocytes de souris (Rose et al., 2005) et *in vivo* dans le cortex préfrontal (Michalak et al., 1996). Cette relâche excessive de glutamate cause une stimulation excitotoxique des récepteurs de glutamate NMDA (*N*-méthyl *D*-aspartate) et induit la mort neuronale *in vitro*. De plus, de hautes concentrations du NH_3 peuvent causer des altérations dans la fonction des mitochondries (Felipo et al., 2002). Par exemple, le NH_3 peut inhiber l'enzyme α -ketoglutarate déshydrogénase du cycle de Krebs dans la mitochondrie dans le cerveau des rats (Lai et al., 1986). Ainsi, des hautes concentrations du NH_3 (hyperammoniémie aiguë) sont extrêmement toxiques pour le SNC. Étant donné que le NH_3 déränge le métabolisme cellulaire, les autres organes sont aussi susceptibles d'être touchés par l'hyperammoniémie. Souvent, lors d'une insuffisance hépatique aiguë où l'hyperammoniémie est présente, plusieurs problèmes s'ajoutent tels que l'insuffisance rénale, la susceptibilité à l'infection et des changements au niveau de la régulation sanguine (Riordan et al., 2000).

Chez les patients cirrhotiques les niveaux artériels du NH_3 sont plus bas que chez les patients avec une insuffisance hépatique aiguë (Kundra et al., 2005). La toxicité du NH_3 est différente dans les conditions chroniques parce que les concentrations sont plus basses, le système peut s'adapter puisque la durée de l'exposition est plus longue. Un relâchement excessif de glutamate est observé chez les patients cirrhotiques dans des stades de coma avancé (Lavoie et al., 1987). Une recherche chez une large population de patients cirrhotiques démontrent qu'une augmentation des niveaux plasmatiques de cytokines (TNF- α) et du NH_3 est en relation avec la sévérité de l'EH (Odeh et al., 2005). De plus, chez les patients cirrhotiques, le NH_3 peut induire une activation des neutrophiles (Shawcross et al., 2010), une altération des niveaux d'acides aminés dans le sang (Marchesini et al., 1982) et dans les muscles (Hayashi et al., 1981). Donc, tant dans

des conditions aiguës que dans des conditions chroniques, le NH_3 a de nombreux effets métaboliques.

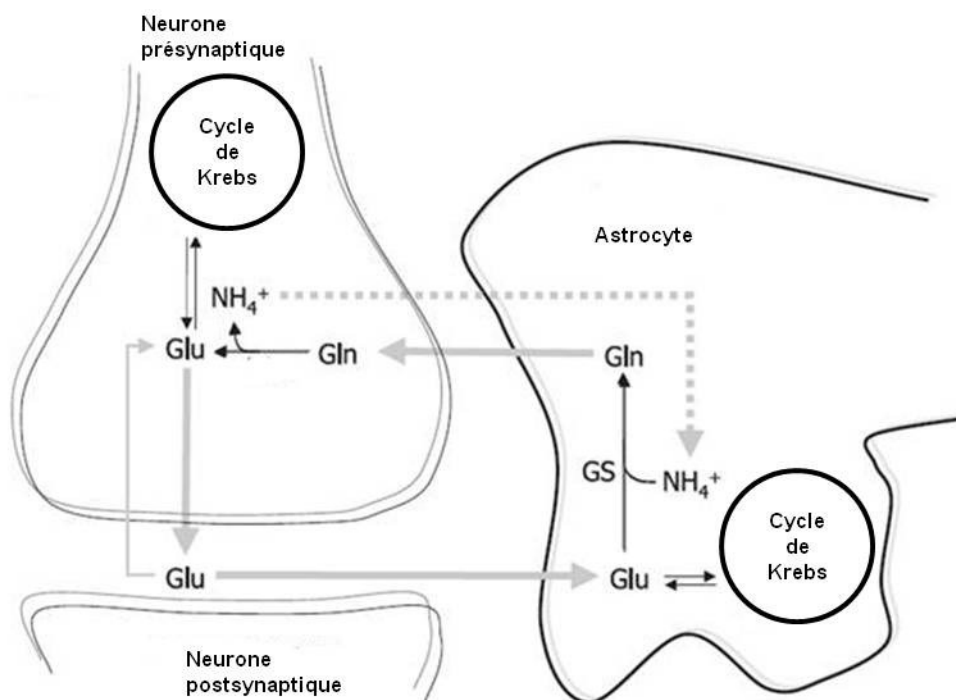


Figure 8. Cycle glutamate/glutamine

Dans le SNC, le glutamate (Glu) est relâché par les neurones. Il peut être recapturé par les astrocytes et converti en glutamine (Gln) par la glutamine synthétase (GS). La Gln est alors exportée et recapturée par les neurones et reconvertie en glutamate pour la prochaine décharge (Image importée et modifiée de Bak et al. (2006)).

Traitement de l'EH

Puisque l'hypothèse de l'implication du NH_3 dans la pathogenèse de l'EH est généralement acceptée et que sa toxicité soit évidente, plusieurs traitements de l'EH visent à en réduire les niveaux. Une transplantation du foie est la solution idéale pour redonner à l'organisme sa capacité à éliminer le NH_3 efficacement. Lorsque la transplantation du foie n'est pas disponible, d'autres stratégies thérapeutiques sont utilisées. Par exemple, les antibiotiques comme le rifaximine sont utilisés pour traiter l'EH en réduisant la population de bactéries produisant du NH_3 dans les intestins (Bass et al., 2010). Puisque les muscles convertissent le NH_3 en glutamine (Desjardins, 1999),

deux agents réducteurs du NH_3 , peuvent être administrés : la L-ornithine L-aspartate par voie intraveineuse (i.v) et la L-ornithine phénylacétate par voie orale. Ils fournissent une source d'acides aminés pour la synthèse de glutamate aux muscles, le substrat principal de la synthèse de glutamine utilisée pour réduire le niveau du NH_3 dans le sang. Ces deux traitements sont efficaces tant chez les modèles animaux que chez les humains (Jalan et al., 2007; Rose et al., 1999b; Ytrebø et al., 2009). Présentement, l'administration d'AST-120 est un nouveau traitement à l'essai cliniquement. Ces microsphères de charbon (0.2-0.4 mm) à surface adsorbante non-spécifique ($1600 \text{ m}^2/\text{g}$) sont administrées oralement. Dans les intestins, elles ne sont pas dégradées et fournissent une surface pouvant adsorber des molécules de faible poids moléculaire ($<10 \text{ kDa}$), dont le NH_3 . Il a été démontré que l'AST-120 diminue les niveaux de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ chez les chiens ayant subi une anastomose portocave (Hiraishi, 1987). Des études préliminaires ont démontré une amélioration des fonctions neurocognitives chez des patients atteints d'EH traités avec de l'AST-120 (Pockros et al., 2009).

2. Stress oxydatif

Radicaux libres oxygénés

En plus du NH_3 , certaines études proposent que le stress oxydatif soit un facteur impliqué dans la pathogenèse de l'EH (Bosoi et al., 2011b; Görg et al., 2010; Norenberg et al., 2004; Seyan et al., 2010). Chez les patients cirrhotiques, la présence de stress oxydatif est une caractéristique notable dans la circulation sanguine (Loguercio et al., 2001). Les radicaux libres oxygénés (ROS) sont relâchés par les hépatocytes endommagés lors d'une cirrhose du foie (Jaeschke, 2011). Un corps est soumis à un stress oxydatif lorsque la production de ROS dépasse largement son élimination (Avery, 2011). Un radical libre est une molécule chimique réactive qui possède un électron non-pairé. Présents naturellement dans les cellules, les ROS sont des radicaux libres contenant de l'oxygène qui possèdent un électron libre sur l'orbitale externe de la molécule (Halliwell, 1992). Cet électron libre va aller chercher un autre électron pour

s'équilibrer en pair. De cette façon, les radicaux libres sont très réactifs et instables. Les exemples les plus connus de ROS sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'anion hydroxyl (OH^{\cdot}) et l'oxyde nitrique ($\cdot NO$). Ils peuvent être générés dans la cellule ou être d'origine exogène. Les sources majeures de production de ROS sont la chaîne respiratoire de la mitochondrie ou les enzymes cytosoliques tels que la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) (Finkel et al., 2000). Un autre exemple de source de ROS est le métabolisme des substances exogènes par les cytochromes P450 du foie (Gonzalez, 2005). Toutefois, l'organisme a plusieurs mécanismes pour contrôler le niveau de ROS. Un de ces mécanismes est l'expression d'enzymes antioxydantes qui vont convertir les ROS en espèces moins réactives. Le superoxyde dismutase, le superoxyde reductase ou le glutathione peroxydase en sont de bons exemples.

Rôle des radicaux libres oxygénés dans la signalisation cellulaire

Les ROS sont essentiels dans un fonctionnement normal de la cellule. Dans un organisme en santé, les ROS ont de multiples fonctions importantes telles que la transduction de signaux intracellulaires (Apel et al., 2004), l'agrégation plaquettaire (Murrell et al., 1990), la médiation de l'apoptose (Buttke et al., 1994) et l'activité antibactérienne des phagocytes (Hassett et al., 1989). L'activation de l'expression de certains gènes et l'inhibition de phosphatases en réponse au stress oxydatif sont des exemples de mécanismes possibles de l'action des ROS dans la signalisation (**Figure 9**) (Apel, 2004).

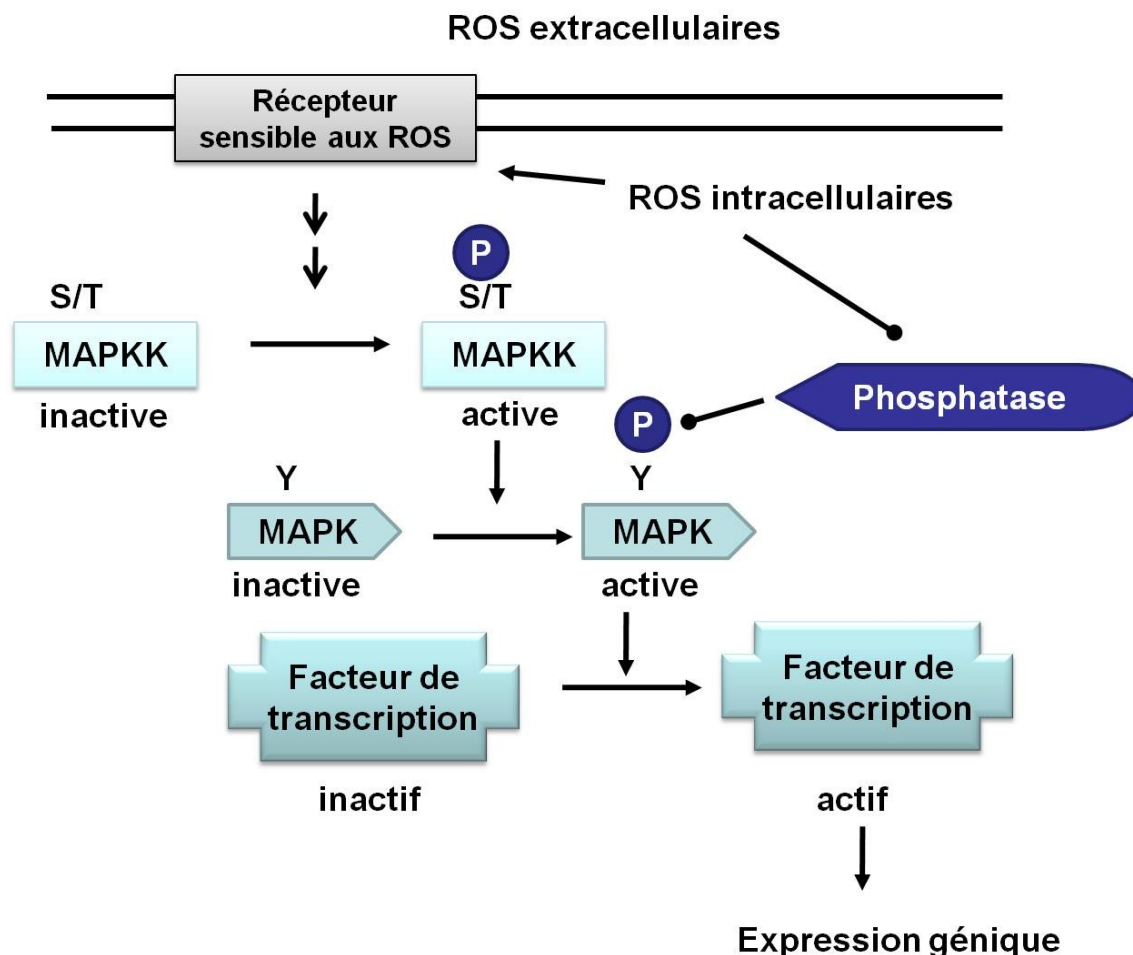


Figure 9. ROS dans la signalisation cellulaire

Des récepteurs membranaires peuvent détecter les ROS intracellulaires et extracellulaires. Ces récepteurs peuvent activer par phosphorylation des résidus de sérine, thréonine ou tyrosine des voies de signalisation comme celle des "mitogen activated protein kinases" (MAPK), qui active des facteurs de transcriptions modulant l'expression génique. Les phosphatases peuvent aussi être inhibées et cela favorise la phosphorylation des kinases (Image adaptée et modifiée d'Apel et al. (2004).

Conséquences négatives du stress oxydatif

D'un autre côté, un excès de ROS peut être néfaste. Les maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington sont associées à une dysfonction mitochondriale menant à une production de ROS (de Moura et al., 2010). Deux des nombreux effets néfastes des ROS sont la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines (Poon et al., 2004). Les ROS dont le $\text{OH}\cdot$

peuvent réagir avec le C-H des lipides et alors pour se stabiliser, le groupe hydroxyl réagira de nouveau pour former un groupe carbonyle. Différents ROS peuvent réagir différemment et produire d'autres molécules plus stables comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) à titre d'exemple. Les ROS peuvent aussi s'attaquer aux acides aminés des protéines. Les ROS réagissent avec le carbone de l'acide aminé et être converti en un groupe carbonyle (C=O) (**Figure 10**) (Poon, 2004). Ces groupes carbonyles peuvent être détectés en les convertissant en des dérivés de dinitrophénol (DNP) avec de la 2,4-dinitrophénol hydrazine (DNPH) qui sont détectables par immunobuvardage. La carbonylation est un mécanisme irréversible et elle est un signal de dégradation des protéines en conditions normales. Cela peut être un mécanisme de contrôle de la qualité de la cellule (Nystrom, 2005). Toutefois, dans plusieurs maladies comme l'Alzheimer ou l'insuffisance rénale où elle est augmentée, la carbonylation est un marqueur de stress oxydatif sévère (Dalle-Donne et al., 2003).

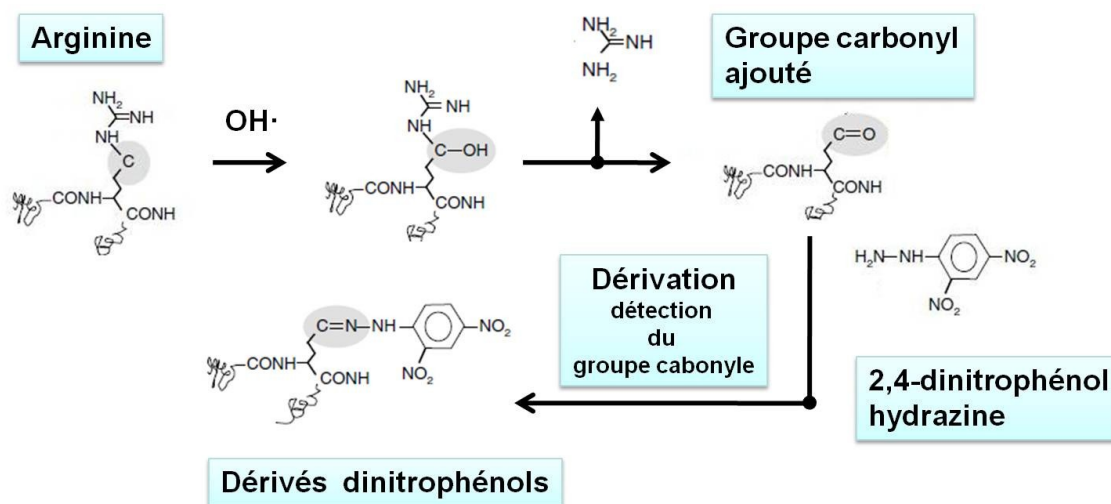


Figure 10. Dérivation du groupe carbonyle des chaînes latérales des protéines

Un groupe carbonyle est introduit dans les acides aminés des chaînes latérales. Ceci est le résultat de l'oxydation des protéines par les ROS. Celui-ci est dérivé avec de la 2,4-dinitrophénol hydrazine en dérivé dinitrophénol détectable par immunobuvardage. (Image adaptée et modifiée de Nystrom (2005))

3. Œdème cérébral

Définition

L'œdème cérébral est une caractéristique observable chez les patients cirrhotiques avec l'EH minimale (Córdoba et al., 2001; Häussinger, 2006; Sugimoto et al., 2008). Il est défini comme une accumulation de fluide dans le parenchyme cérébral qui résulte en un élargissement volumétrique des tissus cérébraux (Klatzo, 1987). Par conséquent, c'est une condition pathologique parce que le gonflement des tissus peut causer une diminution du flot sanguin, une augmentation de la pression intracrânienne et des dommages aux cellules menant à leur dysfonction.

Types d'œdème cérébral

L'œdème cérébral est classifié en deux types : vasogénique et cytotoxique (**Figure 11**). L'œdème vasogénique est causé par un accroissement de la perméabilité de la BHE menant à une augmentation nette de fluide cérébral. Essentiellement, lors d'un œdème vasogénique, la BHE est endommagée et des macromolécules, telles que les protéines dans le plasma ou les ions diffusent paracellulairement vers l'espace extracellulaire du SNC. L'eau pénètre alors dans le cerveau pour tenter de rétablir l'équilibre osmotique. Un œdème vasogénique peut survenir lors d'une infection, d'une hémorragie ou d'une tumeur cérébrale (Nag et al., 2009). Fondamentalement, ces conditions pathologiques endommagent physiquement la BHE et permettent aux macromolécules de passer du sang au cerveau, induisant alors l'œdème cérébral vasogénique.

Un œdème cytotoxique est une perturbation du métabolisme neurocellulaire qui entraîne une prise excessive d'ions par les cellules sans rupture de la BHE. Cette augmentation de concentration d'ions intracellulaires va causer l'entrée d'eau dans les cellules afin de rétablir l'équilibre osmotique. Un œdème cytotoxique est observé lors d'une ischémie cérébrale, d'un trauma crânien et d'infections (Lu et al., 2008; McMinn et al., 2001; Yan et al., 2003). Les cas les plus communs d'œdème cytotoxique se

retrouvent dans l'ischémie cérébrale. Durant l'ischémie, le manque d'oxygène diminue les niveaux d'ATP dans les cellules neuronales. La $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ne peut alors plus réguler les niveaux croissants de Na^+ intracellulaire qui attire l'eau dans la cellule (Nag, 2009). Dans les cultures de neurones de rats, l'excitotoxicité peut aussi activer les récepteurs NMDA qui vont alors activer une cascade qui module les co-transporteurs Na-K-Cl . Ces derniers vont médier l'influx excessif d'ions dans les cellules neuronales (Schomberg et al., 2001).

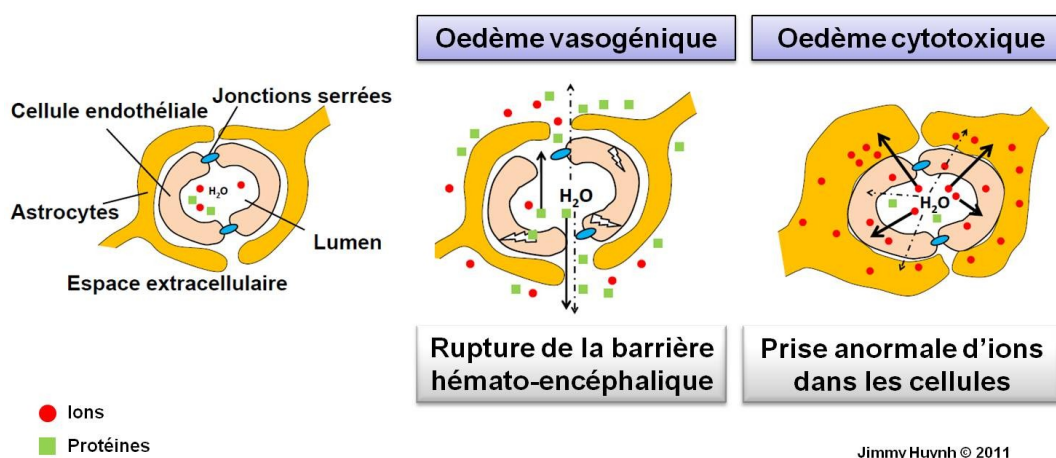


Figure 11. Oedème vasogénique et œdème cytotoxique

L'œdème vasogénique est causé par une rupture de la barrière hémato-encéphalique tandis que l'œdème cytotoxique est causé par une prise anormale d'ions dans la cellule.

Œdème cérébral dans une insuffisance hépatique aiguë

Dans l'insuffisance hépatique aiguë, l'EH est souvent accompagnée d'un œdème cérébral avec une augmentation de la pression intracrânienne et d'une réduction du flot sanguin (Larsen et al., 2008). Ceci est un problème clinique fréquent et une cause majeure de mortalité chez les patients ayant une insuffisance hépatique aiguë (Clemmesen et al., 1999). Il n'a pas encore été déterminé si la pathogenèse de l'œdème cérébral dans une insuffisance hépatique aiguë est de type vasogénique ou cytotoxique. Cependant, le gonflement des astrocytes donne l'indice que c'est d'origine cytotoxique. *In vitro*, une grande concentration du NH_4^+ cause le gonflement des astrocytes (Jayakumar et al., 2008; Norenberg et al., 2005). En effet, les astrocytes possèdent la

plus grande activité en glutamine synthétase dans le SNC (**Figure 7**) (Tansey, 1991). Alors, ils métabolisent majoritairement le NH_3 en glutamine et cet acide aminé pourrait agir comme un osmolyte et attirer l'eau dans les astrocytes (Norenberg, 2005). Chez les rats hépatectomisés, à des stades avancés de coma, à l'aide d'imagerie à résonance magnétique, un laboratoire a trouvé une augmentation d'eau intracellulaire dans toutes les régions du cerveau et aucun changement de la perméabilité de la BHE (Chavarria et al., 2010). Toutefois, les résultats d'études effectuées chez plusieurs modèles d'animaux expérimentaux suggèrent que l'œdème cérébral serait vasogénique. Chez les souris, l'insuffisance hépatique aiguë a été induite par une injection d'azoxyméthane (Nguyen et al., 2006) ou de galactosamine (Yamamoto et al., 2006). Dans ces deux modèles, une augmentation de la perméabilité de la BHE a été détectée indiquant une rupture de celle-ci. Alors, le mécanisme demeure encore nébuleux dans l'insuffisance hépatique aiguë.

Œdème cérébral dans une insuffisance hépatique chronique

Pour l'insuffisance hépatique chronique, la présence d'un œdème cérébral chez les patients cirrhotiques est observable (Sugimoto, 2008). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de pression intracrânienne ni de gonflement des astrocytes contrairement aux patients ayant une insuffisance hépatique aiguë. Détecté par résonance magnétique, il a été remarqué chez les patients cirrhotiques avec l'EH minimale (Lodi et al., 2004; Mardini et al., 2010; Miese et al., 2006; Poveda et al., 2010; Sugimoto, 2008) et avec l'EH (Rovira et al., 2001), sans augmentation de la pression intracrânienne. C'est un œdème où les neurones semblent morphologiquement normaux chez les patients d'EH tandis que les astrocytes exhibent des signes d'altération et de dégénération (Häussinger et al., 2000; Häussinger, 2006). Les études suggèrent que les altérations soient causées par un dérangement de l'homéostasie du volume cellulaire (Córdoba, 2001; Häussinger et al., 1994). Subséquemment, l'œdème consiste en une hydratation anormale des astrocytes sans augmentation de pression intracrânienne détectable cliniquement mais qui corromprait les fonctions gliales. Le mécanisme reste encore incompris mais le NH_3 est encore une hypothèse plausible (Mardini, 2010). Chez les modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique chronique, la présence d'œdème

cérébral a été détectée seulement chez les rats lors d'une administration du NH_3 (Blei et al., 1994; Córdoba et al., 1999; Davies et al., 2009; Rodrigo et al., 2005) et l'injection de facteurs induisant l'inflammation (Wright et al., 2007b). Donc, le NH_3 semble encore avoir un rôle important dans la pathogenèse de l'œdème cérébral malgré le fait que le mécanisme n'a pas été élucidé. Cependant, le mécanisme dans la cirrhose du foie (insuffisance hépatique chronique) n'est probablement pas le même que l'insuffisance hépatique aiguë parce que le niveau du NH_3 dans le sang et la durée d'exposition sont différents. Alors, la pathogenèse de l'œdème cérébral dans une insuffisance hépatique chronique reste encore nébuleuse.

4. Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est le premier obstacle que le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ produit systémiquement, doit traverser pour atteindre le SNC. De plus, plusieurs études suggèrent que l'œdème cérébral touche les astrocytes qui jouent un rôle important dans le maintien de la BHE. Enfin, la BHE forme un mur que les ROS dans le sang rencontrent. L'hyperammoniémie, l'œdème cérébral et le stress oxydatif sont des conditions pouvant endommager la BHE. Pour ces raisons, il est intéressant d'étudier la BHE dans la pathogenèse de l'EH minimale lors d'une insuffisance hépatique chronique.

Au niveau du cerveau, la BHE est l'ensemble des microvaisseaux sanguins spécialisés formant une barrière physique qui séparent la circulation sanguine du SNC (**Figure 12**). Avec les astrocytes, les neurones, les péricytes et la matrice extracellulaire, ces capillaires cérébraux forment l'unité neurovasculaire (Hawkins et al., 2005). Ensemble, ils régulent la prise de nutriments et les échanges ioniques, empêchent les macromolécules et les neurotoxines d'atteindre le cerveau et contrôlent le flot sanguin cérébral. Seules les molécules lipophiliques plus petites que 400 Da avec moins de 9 liens hydrogène et les gaz peuvent diffuser à travers la barrière (Zlokovic, 2008). Les

autres molécules nécessaires au SNC (ions, glucose, acides aminés) doivent être transportées par des protéines de transport pour entrer dans le SNC.

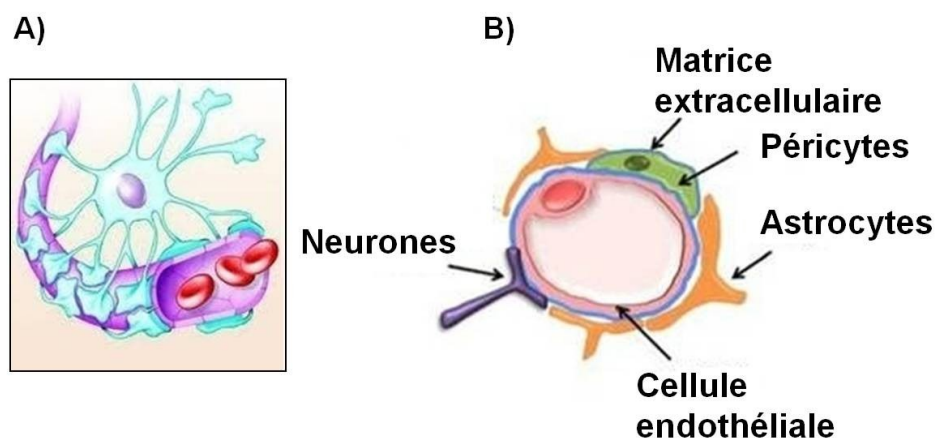


Figure 12. Composantes de l'unité neurovasculaire

A) La BHE forme une barrière de diffusion qui sépare la circulation sanguine du SNC (à gauche). B) La cellule endothéliale, les astrocytes, les neurones, les péricytes et la matrice extracellulaire forment l'unité neurovasculaire de la BHE (à droite). A) Image importée et modifiée de www.protect-and-boost-your-brain.com B) Image importée et modifiée de Tait et al. (2008))

Cellules endothéliales

Une couche de cellules endothéliales forme les microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV) acheminant le sang au cerveau. Les capillaires du SNC sont différents des capillaires du corps parce qu'ils ont une abondance de protéines de jonction serrées (Kniesel et al., 2000), aucun espace paracellulaire (Abbott, 2000), une activité pinocytotique réduite (Sedlakova et al., 1999) et ils sont en contact avec les prolongements des astrocytes. Ces caractéristiques permettent aux cellules endothéliales des capillaires (formant les CMV) de bloquer le passage de toute macromolécule neurotoxique. Un nombre élevé de mitochondries dans ces cellules supporte l'importante activité métabolique nécessaire à la protection du cerveau (Claudio, 1995). Par contre, la BHE n'est pas seulement qu'une paroi imperméable. Les cellules endothéliales présentent un amalgame de récepteurs et transporteur sélectifs pour les acides aminés, les protéines, les peptides et le glucose pour maintenir l'homéostasie

(Zlokovic, 2008). Certaines molécules spécifiques telles que l'insuline et le fer sont transportées dans le SNC par transcytose médiée par récepteur. Enfin, il y a le transporteur d'efflux. Cette fonction est prise en charge par les P-glycoprotéines, les protéines de multirésistance aux médicaments (*multidrug resistance proteins* (MDR proteins)) qui sont spécifiquement exprimées dans la BHE. Ces transporteurs d'efflux expulsent toute macromolécule ou médicament potentiellement toxique hors du SNC (Engelhardt et al., 2009).

Astrocytes

Les prolongements des astrocytes recouvrent les cellules endothéliales. Une couche de matrice extracellulaire les sépare. Leur interaction est cruciale et unique au niveau de la BHE puisque plusieurs études suggèrent que les astrocytes sont nécessaires au développement et au maintien de l'intégrité de la BHE en sécrétant plusieurs facteurs (Abbott et al., 2006), l'*angiopoétine 1*, le *Transforming Growth factor- β* (TGF- β), le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) en sont de bons exemples (Igarashi et al., 1999; Lee et al., 2003). Les interactions entre les astrocytes et la BHE régulent les volumes d'eau dans des conditions normales et pathologiques (Abbott, 2006). La co-culture d'astrocytes de rats avec des cellules endothéliales bovines augmente l'expression des protéines des jonctions serrées (JS) sur celles-ci et réduit l'espace paracellulaire. Il a été suggéré que le *fibroblast growth factor-basic* (bFGF) soit le principal responsable de cet effet (Sobue et al., 1999). En culture, les cellules endothéliales (rat) expriment faiblement le glutamyl-transpeptidase gamma, un transporteur d'acides aminés. Lorsque ces cellules sont mises en culture avec des astrocytes provenant du lobe frontal de cerveau de rat, le niveau de ce transporteur est rétabli à un niveau normal (el Hafny et al., 1996). Il semblerait aussi que les astrocytes médient la perméabilité de la BHE. Pour illustrer ce fait, des chercheurs ont observé que les cultures de cellules endothéliales avaient plus grande imperméabilité aux protéines dans des solutions de culture conditionnées avec des facteurs gliaux que dans des solutions non-conditionnées (Prat et al., 2001). Ainsi, les expériences *in vitro*

démontrent que les astrocytes sont importants pour induire et maintenir le phénotype de la BHE.

Neurones

Une étude a démontré une relation entre l'activité cérébrale et l'apport sanguin au cerveau par les CMV (Paemeleire, 2002). Dans le cortex, la perte de neurones cholinergiques innervant les cellules endothéliales provenant de cultures de tissus humain est associée à une dysfonction de la BHE (Tong et al., 1999). Ce sont des indices que les neurones ne régulent pas seulement le flot sanguin mais aussi qu'ils sont aussi importants pour l'intégrité de la BHE mais les mécanismes ne sont pas encore bien compris. Dans la pathogenèse de l'EH minimale, les neurones ne semblent pas affectés mais ce sont plutôt les astrocytes qui montrent des signes d'altération (Häussinger, 2000).

Péricytes

Dans le SNC, les péricytes sont des cellules qui contribuent à la stabilité des CMV de la BHE et couvrent environ 22 à 32% de la surface endothéliale abluminale des capillaires de la BHE (**Figure 12**). Les vénules de la BHE tendent à être plus couvertes de péricytes (Fisher, 2009). Chez les rats, le ratio péricytes/cellules endothéliales est de 1:5 (Balabanov et al., 1998). Malgré leur nombre plus faible comparé aux autres types de cellules dans le SNC, les péricytes jouent un rôle important. Par exemple, un relâchement de médiateurs spécifiques par les péricytes contribue à la stabilité de la microvasculature de la BHE (von Tell et al., 2006). Des études suggèrent aussi que la dysfonction des péricytes soit impliquée dans le développement de neuropathologies dans l'hypertension, le diabète et la formation de tumeurs cérébrales (Allt et al., 2001; von Tell, 2006).

Jonctions de la BHE

L'espace paracellulaire des cellules endothéliales formant les CMV est caractérisé par la présence des jonctions serrées (JS) et des jonctions d'adhérence qui

lient les cellules ensemble (Hawkins, 2005). Les jonctions serrées sont des complexes de protéines intégrales et cytoplasmiques et du cytosquelette (actine). Elles sont situées près de la surface luminale des CMV et elles sont responsables de la très faible perméabilité paracellulaire de la BHE. Les jonctions d'adhérence médient l'adhésion des cellules endothéliales entre elles. Lors de différentes conditions pathologiques comme l'ischémie (Kago et al., 2006) ou une exposition *in vitro* à l'alcool (Haorah et al., 2007), une altération des protéines de la BHE est trouvée en parallèle avec une augmentation de la perméabilité de celle-ci. Les composantes principales des JS sont la claudine-5, l'occludine, la zonula occludens-1 (ZO-1) et la zonula occludens-2 (ZO-2).

Les jonctions d'adhérence sont localisées avec les JS. La composante principale des jonctions d'adhérence est la cadhérine qui lie les cellules entre elles via leurs interactions homophiliques. Les cadhérines sont liées au cytosquelette par les caténine, vinculine et α -actinine (Sandoval et al., 2008). La présente étude ne s'intéresse pas aux jonctions d'adhérence mais plutôt aux jonctions serrées puisque que celles-ci confèrent essentiellement la faible perméabilité paracellulaire de la BHE en formant des réseaux complexes de protéines qui scellent l'espace paracellulaire (Romero et al., 2003).

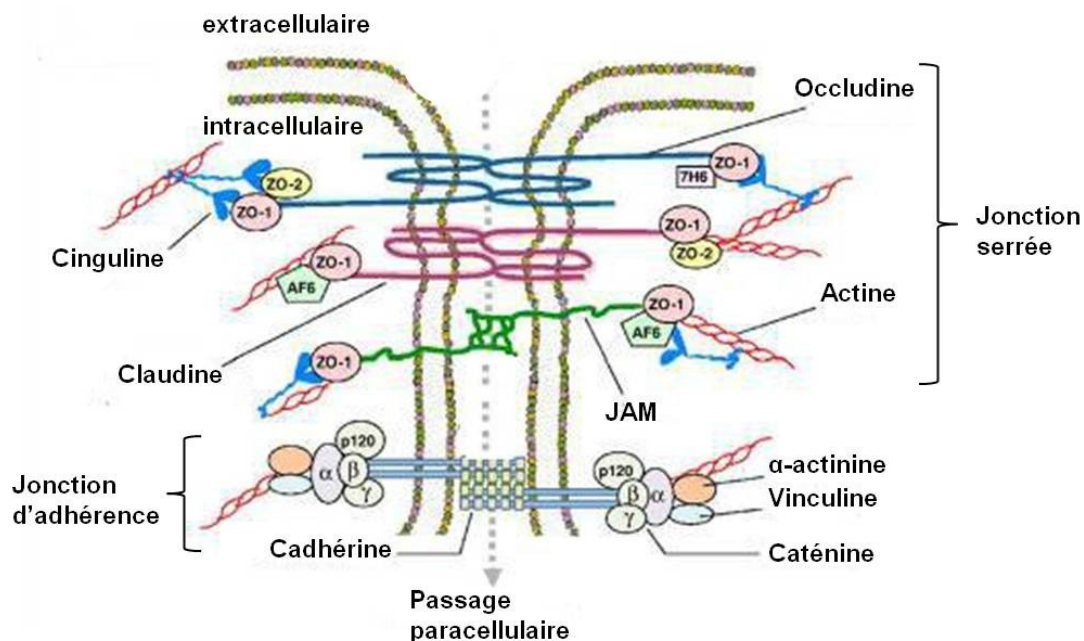


Figure 13. Protéines des jonctions serrées

Les jonctions serrées dans la BHE limite la diffusion paracellulaire de macromolécules. Les protéines intégrales transmembranaires claudine-5 et occludine lient les cellules entre elles et scellent l'espace extracellulaire. Les protéines cytoplasmiques ZO-1 et ZO-2 lient ces protéines intégrales aux filaments d'actine pour assurer la stabilité des jonctions serrées. (Image importée et modifiée de Sandoval et al. (2008)).

Occludine

L'occludine est une protéine intégrale de 65 kDa avec 4 domaines transmembranaires dont les extrémités C- et N-terminales sont orientées vers le cytoplasme (**Figure 13**). La partie extracellulaire se lie homophiliquement aux autres occludines des cellules endothéliales adjacentes et ferme tout espace paracellulaire. Entre les cellules endothéliales de la BHE, elle est hautement exprimée selon un patron continu (Hawkins et al., 2004). De multiples sites de phosphorylation sur des résidus de sérine et thréonine sont impliqués dans la régulation de l'occludine (Rao et al., 2002). *In vivo*, une diminution du niveau d'occludine dans les JS est associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE (Ishrat et al., 2010).

Claudine-5

D'un poids d'environ 20 à 27 kDa, les claudines forment une famille de 24 membres. Ces protéines intégrales ont 4 domaines transmembranaires (**Figure 13**). Il s'avère que les claudines scellent l'espace paracellulaire entre les cellules endothéliales et l'occludine ajoute un support structural (Wolburg et al., 2002). Cette hypothèse s'appuie sur les études montrant que la formation des JS est observable malgré le knockdown et knockout des occludines chez les souris (Saitou et al., 2000). Tout comme les occludines, la phosphorylation joue un rôle dans la régulation des claudines (Findley et al., 2009). L'expression de ces protéines varie dépendamment du type de tissus, les claudine-3, -5 et -12 ont été identifiées dans la BHE. La claudine-5 sera étudiée dans cette recherche car une altération de son expression affecte la perméabilité de la BHE chez les souris knockout (Nitta et al., 2003) et dans des modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë (Chen et al., 2009).

ZO-1 et ZO-2

Les zonula occludens (ZO) sont des phosphoprotéines cytoplasmiques impliquées dans la régulation et l'organisation des protéines de complexes de JS (**Figure 13**). Leur rôle principal est de former un échafaudage pour recruter d'autres protéines et le cytosquelette de la cellule afin de lier les JS au cytosquelette. Elles font partie de la famille des MAGUKs (*membrane associated guanyl kinase like protein*) et possèdent trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK (*Guanylate kinase domain*). Ces motifs permettent l'interaction des ZOs à d'autres protéines ou entre elles. Le domaine PDZ est un domaine structural de 80-90 acides aminés retrouvés dans les protéines de signalisation. C'est un acronyme de post-synaptic density protéine (PSD95), *Drosophila discs large tumor suppressor* (Dlga) et zonula occluden-1, protéine où le domaine a été découvert en premier (Ranganathan et al., 1997). Les domaines PDZ interagissent avec les claudines (**Figure 14**) tandis que le domaine SH3-GUK permet aux ZO-1 de se lier aux autres ZO-1 et aux autres protéines. Plus important encore, l'actine se lie à partie carboxy-terminale des ZOs (Furuse, 2010). Les ZO sont indispensables pour la formation des JS et à leur stabilisation (Umeda et al., 2006).

ZO-1 a un poids de 220 kDa et ZO-2 a un poids de 160 kDa. ZO-1 stabilise les JS et elle est impliquée dans la signalisation cellulaire parce qu'elle peut communiquer l'état des complexes de JS en interagissant avec plusieurs facteurs (protéines intégrales de JS, facteurs de transcription, protéine G, l'actine, etc.). ZO-1 joue un rôle dans la signalisation cellulaire. Par exemple, dans des cultures de cellules épithéliales, ZO-1 se colocalise dans le noyau dans des conditions de prolifération (Gottardi et al., 1996). ZO-2 aurait les mêmes fonctions que ZO-1 (Umeda et al., 2004). Il existe plusieurs autres protéines cytoplasmiques qui jouent un rôle dans le maintien des JS comme la cinguline, le AF-6 et le 7H6. Dans un modèle expérimental d'insuffisance hépatique aiguë de souris, l'expression protéique de ZO-2 est diminuée dans les stages de précoma et cela est observé en parallèle avec une augmentation de la perméabilité de la BHE (Shimojima et al., 2008). Il serait intéressant de voir si l'expression de ZO-2 corrèle aussi avec la perméabilité de la BHE dans les modèles d'insuffisance chronique.

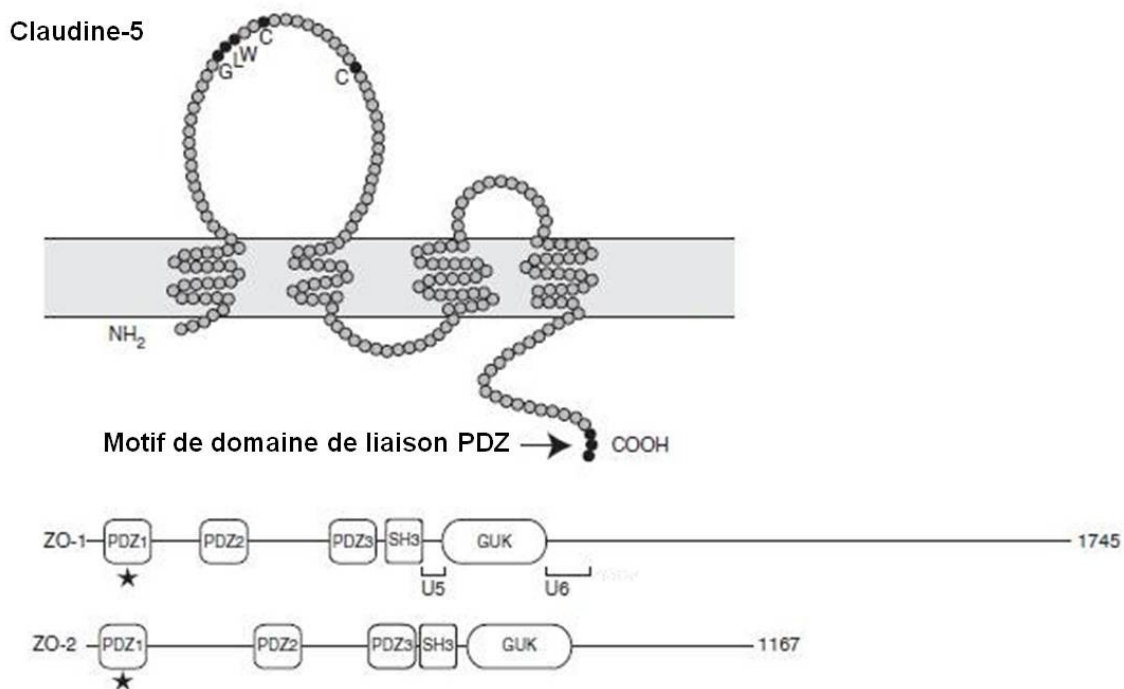


Figure 14. Claudine-5 et ZOs

Le domaine PDZ1 (étoile) de ZO-1 et ZO-2 interagit avec le motif de domaine de liaison PDZ de la claudine-5. Avec les autres domaines (PDZ, SH3 et GUK), les ZOs sont des protéines d'échafaudage qui interagissent avec diverses protéines pour lier les protéines intégrales au cytosquelette de la cellule (Images importées et modifiées de Furuse (2010)).

Molécules d'adhésion jonctionnelle

Les molécules d'adhésion jonctionnelle (*Junctional Adhesion Molecules*, JAM) font partie de la famille des immunoglobulines et sont localisées dans les JS (**Figure 13**). Les JAMs ont un domaine intracellulaire et un domaine extracellulaire qui interagissent avec les autres JAM de manière homophile. Leur rôle principal est de stabiliser les jonctions et de contribuer à la perméabilité de la BHE. Dans le cytosol, le domaine intracellulaire des JAM peut interagir avec ZO-1 et AF-6 afin de les lier au cytosquelette (**Figure 13**) (Sandoval, 2008).

Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire sert de point d'ancrage et de support aux cellules endothéliales. Elle est composée de protéines structurales (collagène et élastine), de protéines spécialisées (fibronectine et laminine) et de protéoglycans (Cardoso et al., 2010). Les cellules du SNC expriment des récepteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire qui ancrent les cellules à celle-ci (Zlokovic, 2008). Une étude *in vitro* suggèrent que les péricytes puissent contribuer à la formation de matrice extracellulaire (Brachvogel et al., 2007). Plusieurs maladies neurologiques comme la sclérose en plaques, les tumeurs cérébrales, la neuroinflammation et l'ischémie cérébrale mènent à une activation des MMP qui dégradent la matrice extracellulaire (Lukes et al., 1999).

Métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des endopeptidases qui dégradent la matrice extracellulaire. Elles ont le zinc et le calcium comme co-facteur. Elles peuvent aussi jouer un rôle dans la signalisation cellulaire en dégradant des substrats comme des facteurs de transcription ou des ligands (Rosell et al., 2008). Elles font partie de la famille de métalloprotéinases dont 25 membres sont actuellement connus. Leur rôle principal est le remodelage de la matrice extracellulaire des tissus durant le développement et dans des conditions normales. Habituellement, les MMP possèdent trois domaines : un domaine propeptidique en N-terminal, un domaine intérieur catalytique avec un résidu cystéine qui interagit avec le zinc et un domaine C-terminal (Visse et al., 2003). Elles sont synthétisées et sécrétées dans l'espace extracellulaire sous forme de pro-enzymes inactives. Leur activation précède la dissociation de l'interaction cystéine-zinc et du clivage protéolytique du domaine propeptidique. Leur expression varie selon le type de cellule. Les cellules endothéliales expriment principalement MMP-9, les péricytes expriment MMP-9 et MMP-3 et les astrocytes expriment MMP-2 à leurs prolongements (Candelario-Jalil et al., 2009).

Dans la cirrhose du foie, une augmentation notable des MMP dans le sérum des patients est observée (Helaly, 2011). Dans des modèles d'insuffisance hépatique aiguë

chez la souris, une étude suggère que le foie serait une source de MMP-9 et cette dernière contribuerait à l'augmentation de la perméabilité de la BHE (Nguyen et al. 2006). Dans le cerveau adulte, une multitude de MMP sont exprimées et plusieurs deviennent actives et surexprimées en réponse à des lésions ou conditions pathologiques (Dzwonek et al., 2004). Par exemple, dans la sclérose en plaques, des chercheurs démontrent qu'il y a rupture de la BHE où la présence de MMP-9 a été détectée (Cossins et al., 1997). L'augmentation de l'expression de MMP-2 et MMP-9 est associée à une altération de la BHE dans l'apparition de l'œdème dans l'ischémie cérébrale (Ishrat, 2010; Rosenberg et al., 1998; Shigemori et al., 2006). En diminuant l'expression des MMP dans le cerveau de rat, ils observent une amélioration dans la perméabilité de la BHE (Ishrat, 2010). Finalement, chez les souris, il a été déterminé que le stress oxydatif médie la rupture de la BHE par l'activation de MMP-9 dans des conditions d'ischémie (Gasche et al., 2001). Cela suggère que le stress oxydatif module les MMP. Donc, trois conditions peuvent augmenter l'expression des MMP : une cirrhose du foie, une lésion dans les tissus du SNC (œdème cérébral) et le stress oxydatif. Ainsi, il serait intéressant déterminer si les MMP jouent un rôle au niveau de la BHE puisque ces trois conditions peuvent être observées lors de la cirrhose du foie. Il y a d'autres conditions pouvant mener à une augmentation de l'expression des MMP : les facteurs d'inflammation (Candelario-Jalil, 2009), les cellules cancérigènes (Lukes, 1999) et les cytokines (Kim et al., 2005).

5. Le co-transporteur Na-K-Cl

La pathogenèse de l'œdème cérébral chez les patients cirrhotiques reste encore nébuleuse. Certaines études suggèrent qu'elle soit vasogénique (Kahle et al., 2010; Poveda, 2010) et d'autres croient plutôt qu'elle soit d'origine cytotoxique (Córdoba, 2001; Häussinger, 1994). Pour comprendre l'œdème cytotoxique, il est avantageux d'étudier les transporteurs d'ions parce qu'une accumulation anormale d'ions pourrait être une cause possible de cette condition pathologique. Le co-transporteur Na-K-Cl (NKCC) sur la BHE est une cible intéressante parce qu'il a été démontré que ce co-

transporteur joue un rôle dans la pathogenèse de l'œdème dans l'insuffisance hépatique aiguë, l'ischémie cérébrale et le trauma crânien (Jayakumar et al., 2011; Kahle et al., 2009; Lu, 2008).

Fonctions et structure

Plus de 70% de l'eau se situe dans le compartiment intracellulaire. Dans ce compartiment, les $[K^+]$ sont plus élevées que dans l'espace extracellulaire où se retrouvent plutôt des hautes concentrations de Na^+ et de Cl^- . Le maintien de ces gradients ioniques est important parce qu'une altération de la concentration intracellulaire ou extracellulaire de ces solutés peut modifier le volume d'eau cellulaire. Puisque le co-transporteur Na-K-Cl (NKCC) est un régulateur du volume cellulaire (Haas, 1994; Kahle, 2009), il est intéressant de considérer son implication dans la pathogenèse de l'œdème cérébral dans l'EH minimale.

Le NKCC est une protéine transmembranaire qui transporte un ion de Na^+ , un ion de K^+ avec 2 ions de Cl^- . Alors, c'est un transport d'ion dont l'effet net est électroneutre. Généralement, le co-transporteur fait passer les ions de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule grâce aux gradients de Na^+ et de Cl^- (Kahle, 2009). Donc, le NKCC joue un rôle fondamental dans le transport des ions, le maintien des gradients d'ions et la régulation du volume cellulaire (Haas, 1994). Il existe deux isoformes de NKCC : le NKCC2 qui se retrouve exclusivement dans les reins et le NKCC1 qui est ubiquitaire (Kaplan et al., 1996). Le NKCC1 a un poids moléculaire d'environ 130 kDa, un domaine central (12 domaines transmembranaires) dont les extrémités C- et N-terminales sont intracellulaires et deux sites de glycosylation entre le 7^e et 8^e domaine transmembranaire. Le domaine central est responsable de la translocation des ions (Isenring et al., 1997). Le site de liaison du Cl^- se situe aux domaines transmembranaires 2, 4 et 7 (Isenring et al., 1998b). Aux extrémités C- et N-terminales, il y a plusieurs sites de phosphorylation sur des résidus de serine et thréonine pour la régulation du NKCC1 (Haas, 1994; Isenring, 1998b).

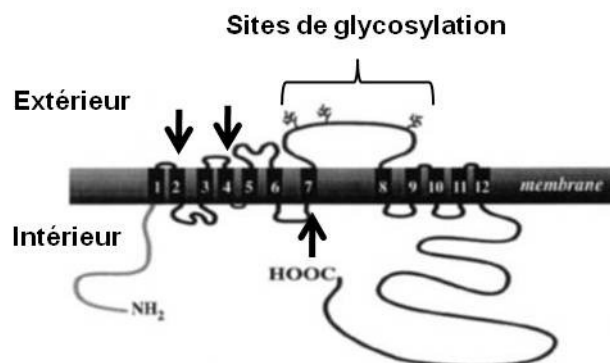


Figure 15. Structure du NKCC1

Le NKCC1 est une protéine de transport possédant 12 domaines transmembranaires et qui transporte un ion de Na⁺, de K⁺ et 2 ions de Cl⁻. Le transport est généralement dirigé vers l'espace intracellulaire, où il suit les gradients de Na⁺ et Cl⁻. Les domaines transmembranaires 2, 4 et 7 sont impliqués dans la liaison de Cl⁻ au co-transporteur (flèches). Entre les domaines 7 et 8 se trouvent des sites de glycosylation pour la maturation des protéines. Image importée et modifiée de Kaplan et al. (1996)

Rôle dans le développement de l'œdème cérébral

Dans les heures suivant une ischémie cérébrale, l'œdème cérébral se développe à la suite d'une prise nette de Na⁺ et d'eau à travers une BHE physiquement intacte (Menzies et al., 1993). Plusieurs études chez des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale suggèrent que le NKCC1 y joue un rôle important. Dans ces modèles, l'ischémie est induite par l'occlusion de l'artère cérébrale gauche. Yan et al. (2001) ont démontré qu'après 2 heures d'ischémie cérébrale focale chez les rats, une augmentation des protéines du NKCC1 a été observée dans le cortex et le striatum. Ils ont pu associer la fonction du NKCC1 à l'augmentation d'eau observée dans leur modèle puisque l'administration de bumétanide (BUM), un inhibiteur de NKCC, directement au cerveau par microdialyse atténue l'augmentation du volume cérébral. Chez les souris mutantes NKCC1^{+/-} et ^{-/-}, l'augmentation d'eau dans le cerveau est moins marquante que chez les souris NKCC1^{+/+} après une ischémie cérébrale focale de 2 heures (Chen et al., 2005b). Enfin, les résultats expérimentaux de O'Donnell et al. (2004b) dirigent l'attention sur les NKCC1 de la BHE. Déterminée par microscopie électronique, une proportion de 80%

des NKCC1 de la BHE se trouve sur la surface apicale des capillaires. L'injection intraveineuse de BUM, qui ne traverse pas la BHE, dans leur modèle d'ischémie chez le rat atténue l'œdème cérébral. Ainsi, l'inhibition du NKCC1 sur la BHE prévient l'augmentation d'eau dans les tissus cérébraux.

Il a été démontré que NH_4^+ peut substituer l'ion K^+ dans le NKCC1 dans des cultures cellulaires et tissus cérébraux, particulièrement dans les astrocytes de l'hippocampe de souris (Kelly et al., 2010). Dans les oocytes, la NH_4^+ serait responsable de l'accumulation intracellulaire de Cl^- via le NKCC1 (Keicher et al., 1994). Des études à partir de cultures d'astrocytes ont permis de conclure que dans des solutions où la concentration de NH_4^+ est élevée, des augmentations du NKCC1 sont associées au gonflement glial de rat (Jayakumar, 2008). Dans un modèle d'insuffisance hépatique aiguë, les auteurs associent l'expression du NKCC1 dans les tissus corticaux à l'œdème cérébral où un traitement avec de la BUM a atténué l'œdème cérébral (Jayakumar, 2011). Il est donc intéressant d'étudier le NKCC1 dans l'insuffisance hépatique chronique.

Régulation du NKCC1

La régulation du NKCC1 a été bien documentée dans les cellules endothéliales (**Figure 16**). La phosphorylation sur les résidus thréonine et sérine est nécessaire à l'activation du NKCC1 (Flemmer et al., 2002; Flemmer et al., 2010; Lytle et al., 1992). Des études suggèrent que cette tâche soit acquittée par les protéines kinases C (PKC). Dans des cultures de cellules endothéliales cérébrales de bovin soumises à des conditions d'hypoglycémie et d'hypoxie, une augmentation de PKC est associée à une augmentation de l'activité de NKCC (Yang et al., 2006) et une inhibition de PKC par la stauroporine réduit l'activité basale de NKCC dans des cultures primaires de capillaires cérébraux de rat (Vigne et al., 1994). Dans une lignée de cellules épithéliales, il semble aussi que la β -actine interagisse avec PKC et le NKCC1 pour la régulation fonctionnelle (Liedtke et al., 2003).

Selon d'autres études, la phosphorégulation dans les cellules endothéliales serait menée par les kinases *With No Lysine* (WNK), des kinases qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine, dont le WNK3 qui est présente dans les tissus cérébraux (Kahle, 2010; Anselmo et al., 2006; Huang et al., 2008). L'activation des WNK par un changement du volume cellulaire est un mécanisme encore nébuleux (**Figure 16**) (Kahle, 2010). Par exemple, dans un milieu hyperosmotique, les cellules doivent capturer les ions afin de rétablir l'équilibre osmotique et alors, le NKCC1 doit être activé. Les WNK détectent ce déséquilibre et activent le SPAK (STE20/SPS1 related Proline-Alanine-rich Kinase) et le OSR1 (Oxidative Stress Response kinase 1) par phosphorylation. Ces kinases iront ensuite se lier physiquement au NKCC pour initier son activation par phosphorylation. En parallèle, le WNK va inhiber le co-transporteur K-Cl (KCC), qui transporte un ion de K^+ et Cl^- hors de la cellule (Kahle, 2010). Un groupe en Angleterre a identifié un motif RFVX (Arg-Phe-Val-Xaa) auquel le domaine carboxy terminal de SPAK et OSR1 se lie pour induire la phosphorylation du NKCC1 (Vitari et al., 2006). Dans des cultures de neurones de rat, des chercheurs ont vu une diminution d'expression de SPAK et OSR1 de 50% et ont observé une diminution de l'activité du NKCC1 en parallèle (Geng et al., 2009). Une suppression du WNK réduit l'activation et la phosphorylation de SPAK et OSR1 induites par le stress hyperosmotique (Zagórska et al., 2007). Alors, les WNK ont une grande influence sur l'activité des NKCC1.

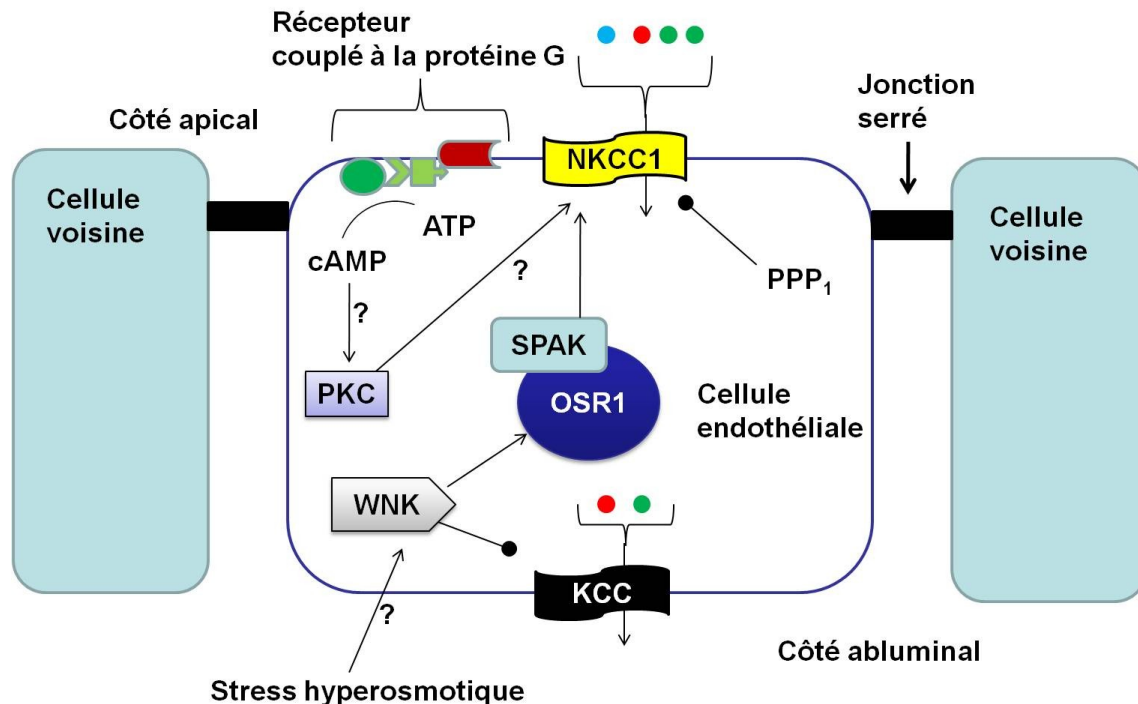


Figure 16. Régulation du NKCC1 dans les cellules endothéliales

Le stress hyperosmotique active les WNK qui vont phosphoryler SPAK et OSR1. Ces derniers vont phosphoryler le NKCC1 pour l'activer. En parallèle, les WNK vont inhiber les KCC. Les phosphatases (PPP_1) inactivent le NKCC1 en les déphosphorylant. Les PKC seraient aussi impliquées dans la phosphorylation du NKCC1. Les ions sont représentés par des points de couleur (Na^+ en bleu, K^+ en rouge et Cl^- en vert).

D'autres mécanismes de l'activation du NKCC1 observés dans d'autres types cellulaires sont à considérer. Dans une étude, les auteurs croient que la phosphorylation du NKCC est associée à l'activation de la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) dans les cardiomyocytes de rat (Andersen et al., 2004). Des études dans les neurones humains suggèrent que le glutamate active les récepteurs de glutamate métabotropique. Ces récepteurs activent des cascades menant à l'activation de PKC et ultimement à la phosphorylation du NKCC1 (Sun et al., 1998). Enfin, l'inhibition de phosphatases de protéines 1 (*Protein phosphatase 1* (PPP_1)) augmente l'activité du NKCC1 (Vigne, 1994). Peu importe le mécanisme d'activation et le type de cellule, la phosphorylation du NKCC1 est bien documentée et semble être le mécanisme majeur de son activation.

6. Modèle animaux d'EH

Deux modèles de rats d'EH minimale sont utilisés dans la présente étude: la ligature de la voie biliaire (BDL) et l'anastomose portocave (PCA).

Ligature de la voie biliaire (BDL)

Chez les rats, le modèle animal de type C, BDL, consiste en une ligature de la voie biliaire pour 6 semaines (**Figure 17**). Alors, la bile s'accumule dans le foie et cause graduellement la cirrhose du foie. Le foie endommagé ne peut plus détoxifier le NH_3 et ainsi une hyperammoniémie et une augmentation du niveau du NH_3 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) en résulte. En plus de l'hyperammoniémie, un œdème cérébral, la présence de stress oxydatif et une insuffisance hépatique sont les principales caractéristiques de ce modèle (**Figure 18**) (Bosoi et al., 2011a). Le BDL est un modèle d'EH minimale où on observe une diminution de l'activité locomotrice (Chan et al., 2004), une déficience de la mémoire spatiale (diminution de fonction cognitives) (Huang et al., 2004), la formation de collatérales portosystémiques et l'hypertension dans la veine porte hépatique (Kountouras et al., 1984).

Ligature de la voie biliaire (BDL) 6 semaines

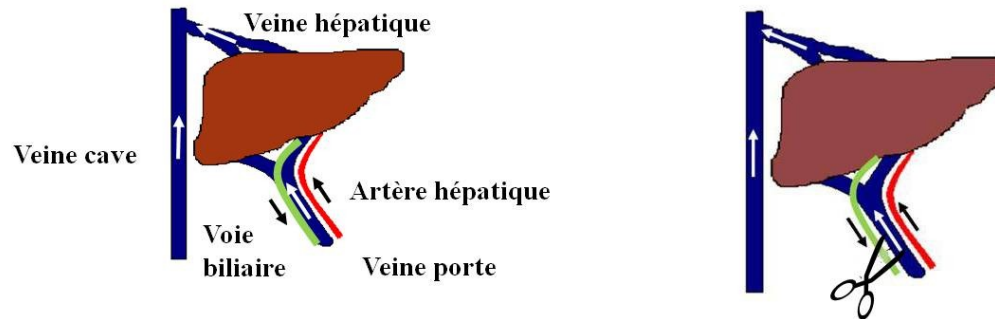


Figure 17. Ligature de la voie biliaire (BDL)

La ligature de la voie biliaire consiste à ligaturer la voie biliaire pour empêcher la bile de sortir du foie. Alors, la bile s'y accumule et entraîne la cirrhose du foie.

Ligature de la voie biliaire (BDL) 6 semaines

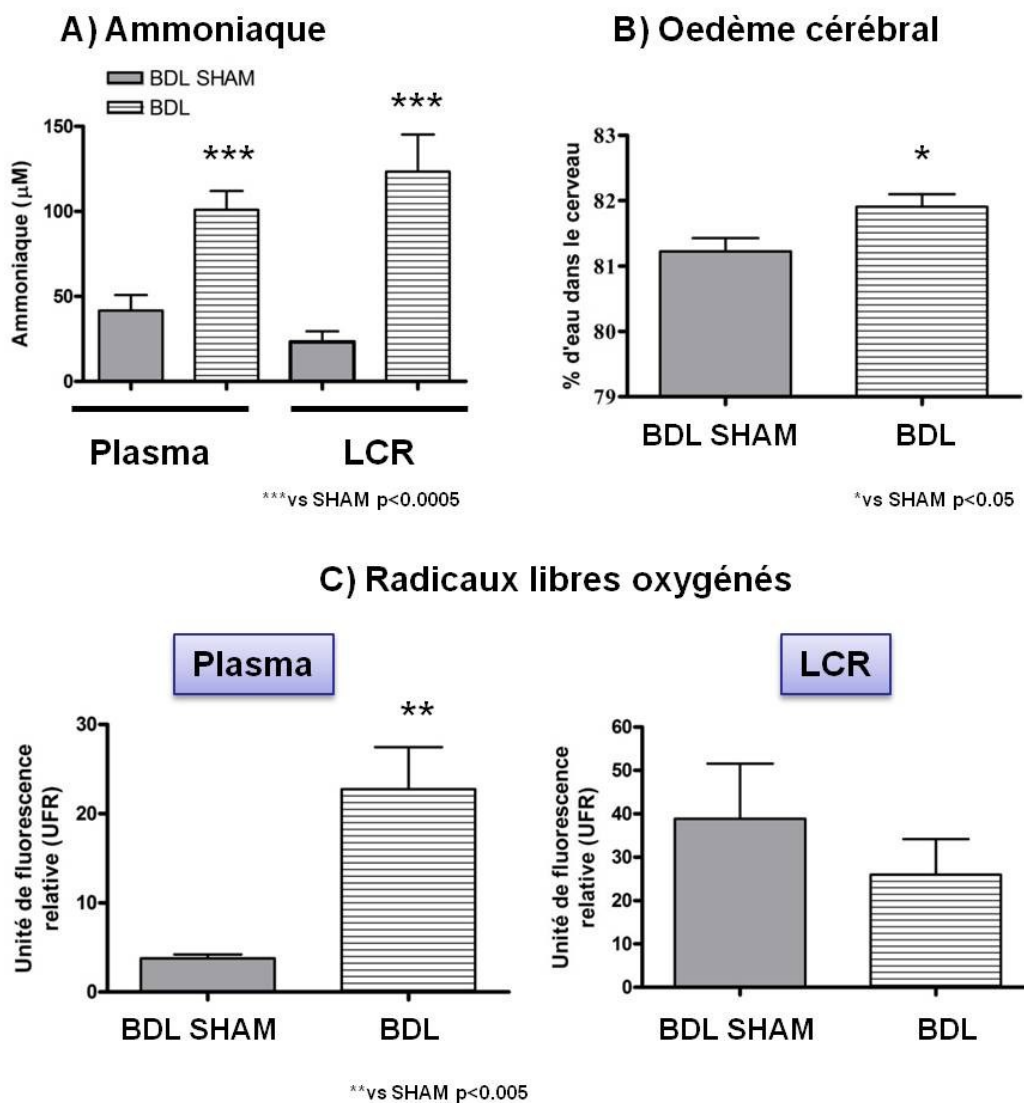


Figure 18. Caractéristiques du modèle BDL

Il présente de l'hyperammoniémie et une augmentation de la concentration d'ammoniaque ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) dans le LCR (A), un œdème cérébral (B) et une augmentation de ROS dans le plasma mais pas dans le LCR (C) Ces résultats proviennent de l'article de l'auteure Bosoi (2011b).

Anastomose portocave (PCA)

Dans des conditions physiologiques, 70% du sang amené au foie passe par la veine porte tandis que le reste passe par l'artère hépatique. Ce modèle chirurgical de rat de 4 semaines consiste en une anastomose de la veine porte hépatique à la veine cave inférieure sans dommage intrinsèque au foie qui devient malgré tout atrophié (**Figure 19**). De cette manière, le sang est dévié vers le système circulatoire et la filtration et la détoxification par l'organe hépatique devient drastiquement moins efficace. Une hyperammoniémie, un foie atrophié et une augmentation de la concentration de NH_3 dans LCR sont observés. Contrairement au BDL, il n'y a pas d'augmentation de fluide dans le cerveau ni de stress oxydatif systémique (**Figure 20**) (Bosoi, 2011b; Yang et al., 2010). Ainsi, pour différencier les effets de l'hyperammoniémie et du stress oxydatif sur la perméabilité de la BHE chez les rats BDL, le modèle PCA sera étudié parce qu'il y a la présence d'hyperammoniémie chronique sans stress oxydatif systémique. Les rats PCA présentent une augmentation de glutamine dans le cerveau (Cordoba et al., 1996), une déficience en apprentissage (Méndez et al., 2009) et une hypolocomotion (Cauli et al., 2006). Le PCA est un bon modèle de type B pour représenter l'EH minimale chez les humains (Jover et al., 2005).

Anastomose portocave (PCA) 4 semaines

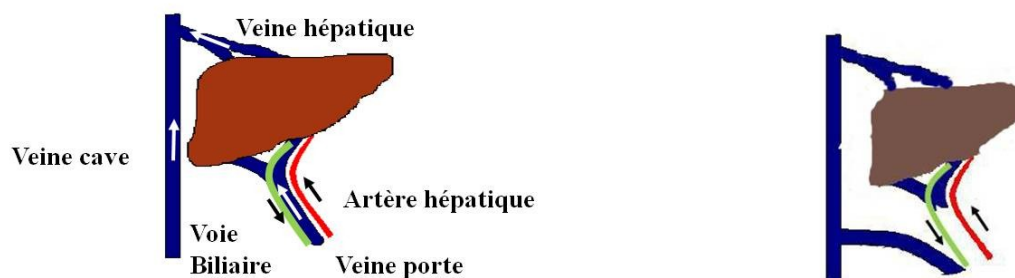


Figure 19. Anastomose portocave (PCA)

L'opération chirurgicale consiste à faire une anastomose de la veine porte à la veine cave. Le sang provenant des intestins passe alors de la veine porte à la veine cave vers la circulation systémique, sans être filtré au préalable par le foie.

Anastomose portocave (PCA) 4 semaines

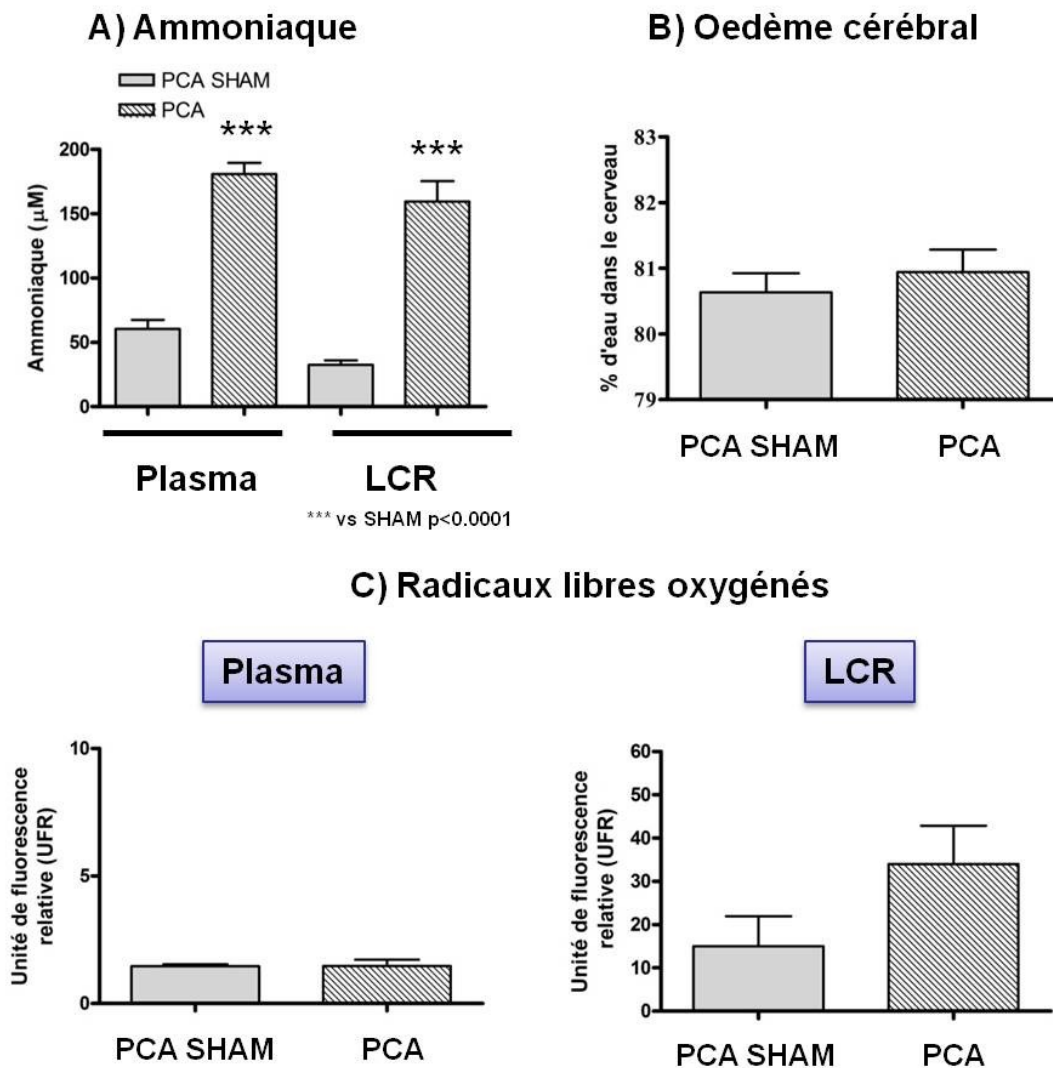


Figure 20. Caractéristique du modèle PCA

Il présente une hyperammoniémie et une augmentation d'ammoniaque ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) dans le LCR (A). Contrairement au modèle BDL, il n'y a pas d'œdème cérébral (B) ni d'augmentation de ROS dans le plasma et le LCR (C). Ces résultats proviennent de l'article de l'auteure Bosoi (2011b).

7. But du projet

L'œdème cérébral est présent chez les patients avec une cirrhose du foie et l'EH minimale et l'hyperammoniémie jouent un rôle important dans ces pathogenèses. Il est présentement incertain si cet œdème cérébral se développe vasogéniquement, à cause d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou cytotoxiquement, à cause d'une prise anormale d'ions par les cellules. Or, la BHE est la porte d'entrée de l'ammoniaque au cerveau, qui peut utiliser les transporteurs de K^+ de la BHE. De plus, il a été démontré que le NKCC1 joue un rôle important dans la pathogenèse de l'œdème cérébral dans des modèles d'ischémie cérébrale où une administration de BUM atténue l'œdème.

Le **premier but** était d'étudier l'intégrité de la BHE dans l'œdème cérébral d'un modèle de cirrhose expérimentale afin de définir son origine. Pour ce faire, le modèle BDL a été sélectionné parce qu'il présente des caractéristiques particulières : un œdème cérébral, une hyperammoniémie, une cirrhose du foie et du stress oxydatif dans le plasma. Le **deuxième but** était de définir l'effet de l'hyperammoniémie chronique sur l'intégrité de la BHE. Pour l'atteindre, un modèle d'hyperammoniémie (PCA) chronique sans cirrhose du foie, stress oxydatif ou œdème cérébral a été utilisé. Ainsi, il a permis de mieux comprendre l'effet de l'hyperammoniémie chronique sans facteur pathologique additionnel dans la perméabilité de la BHE. L'intégrité de la BHE a été définie par trois expériences : étude de la perméabilité de la BHE, étude de l'intégrité des JS dans la BHE et étude d'un marqueur d'œdème vasogénique. Le **troisième but** était d'élucider le rôle du NKCC1 dans la pathogenèse de l'œdème cérébral chez les rats BDL. Finalement, le **quatrième but** était d'identifier le rôle du stress oxydatif systémique dans la pathogenèse de l'œdème cérébral chez les rats BDL.

Matériel et méthodes

1. Modèles expérimentaux

Ligature de la voie biliaire (*bile duct ligation (BDL)*)

Un modèle de type C de l'EH a été choisi pour l'étude. Des rats mâles Sprague Dawley (250-270 g) (Charles River, Saint-Constant, Canada) ont subi une ligature de la voie biliaire. Les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane. Après la laparotomie, les lobes du foie ont été rétractés afin d'exposer la voie biliaire. Ensuite, la voie biliaire principale a été ligaturée selon les procédures décrites dans Rose et al. (1999a). Avant la ligature, 1 µl/g de poids corporel de formaline a été injectée dans le cholédoque afin d'empêcher la dilatation de la voie biliaire ligaturée. L'incision a été refermée avec de la soie 4-0. Le groupe contrôle BDL SHAM était des rats de même âge et sexe dont la voie biliaire a été isolée mais n'ayant pas subi d'injection de formaline ni de ligature après la laparotomie. La chirurgie a duré environ 20 min. Six semaines plus tard, les rats ont été sacrifiés par décapitation. L'hémisphère gauche a été utilisé pour la détermination de l'œdème immédiatement après le sacrifice. L'hémisphère droit et le plasma artériel ont été conservés à -80°C.

Anastomose portocave (*portocaval anastomosis (PCA)*)

Un modèle de type B de l'EH a aussi été sélectionné pour l'étude. L'anastomose de la veine porte hépatique à la veine cave inférieure a été exécutée chez des rats mâles Sprague-Dawley (250-270 g) (Charles River) selon les méthodes de Lee et al. (1961). Brièvement, les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane. Suite à une laparotomie, les veines porte et cave inférieure ont été isolées. Une ligature et un découpage de la veine porte ont été réalisés, tandis que la veine cave inférieure a été pincée et qu'une portion elliptique de 1,5 fois la taille de la veine porte a été enlevée. La PCA a été effectuée

sous microscope en moins de 15 min (dérivation de la veine porte à la veine cave). Les veines porte et cave inférieure des PCA SHAM de même âge et sexe ont été bloquées pour 15 min sans anastomose. L'incision a été refermée avec de la soie 4-0. Les animaux ont été sacrifiés après 4 semaines. Le cerveau des rats PCA a été séparé en hémisphères. L'hémisphère droit a été conservé à -80°C. Les expériences ont été menées en suivant les directives du Conseil Canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du centre de recherche (CIPA) du CRCHUM.

2. Traitement chez les rats BDL

Traitement avec la bumétanide et l'AST-120

Les rats BDL SHAM (n = 6) et BDL (n = 6) ont été traités avec de la bumétanide (BUM ; Biomol, Plymouth Meeting, USA), un inhibiteur de NKCC qui se lie au site de liaison du Cl⁻. Une solution de 10 mg/ml de BUM a été préparée. Des gouttes de NaOH ont été ajoutées afin de dissoudre la BUM. Le traitement a été une dose quotidienne de 10 mg/kg de BUM injectée par voie intrapéritonéale (i.p), pendant 10 jours, à partir de la 32^{ème} journée après la ligature de la voie biliaire.

Les microsphères de charbon, AST-120 (Ocera Therapeutics Inc, San Diego, USA), ont été administrées par gavage à chaque 12 h, aux rats BDL SHAM (n = 4) et aux rats BDL (n = 4) pendant 6 semaines après la première journée de l'opération chirurgicale. Ces groupes ont reçu l'AST-120 dissous dans de la méthylcellulose (Sigma, St-Louis, USA) (10 ml/kg/gavage) à une dose de 1 g/kg/jour. Un groupe contrôle a reçu des volumes équivalents de méthylcellulose.

Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à l'Evans Blue et à la fluorescéine de sodium

Les rats PCA et PCA SHAM et les rats BDL et BDL SHAM ont été anesthésiés avec de l'isoflurane. Ensuite, une solution de 2% d'*Evans Blue* (EB) (4 ml/kg) et une solution de 10% de fluorescéine de sodium (1 ml/kg) (NaF) ont été injectées par voie

intraveineuse dans la veine caudale (Krizbai et al., 2005). Il a été permis aux rats de se réveiller et de se mouvoir librement dans la cage. Après 30 min, une thoracotomie a été exécutée. L'atrium droit a été perforé et les animaux ont été perfusés avec une solution de saline injectée dans le ventricule gauche. Enfin, le cerveau entier a été prélevé et conservé à -80°C. Seuls ces cerveaux ont été perfusés dans cette étude.

Un contrôle positif a été élaboré afin de déterminer si la technique de d'évaluation de la perméabilité de la BHE était valide. Dans un groupe de rats naïfs, une solution de 25% mannitol (5 ml/kg) a été injectée dans l'artère carotide gauche dont le protocole chirurgical a été adapté à partir de Kozler et al. (2003). Brièvement, suivant une incision de l'œsophage entre les épaules, l'artère carotide gauche a été isolée. La solution de mannitol a été injectée lentement, en moins de 5 min. Après 5 min, les solutions d'EB et de NaF ont été injectées respectivement en moins de 5 min dans l'artère carotide gauche. Les cerveaux ont été recueillis comme précédemment.

3. Étude de la barrière hémato-encéphalique

Détermination des niveaux d'EB et de NaF

Le protocole a été adapté à partir de Kaya et al. (2003). Provenant des cerveaux entiers perfusés avec de la saline, les cortex cérébraux ont été recueillis sans le cervelet et le tronc cérébral et disséqués sur de la glace. Les tissus ont été homogénéisés dans une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS, 13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM KH₂PO₄). Une solution de 60% d'acide trichloroacétique a été ajoutée dans une proportion de 1:1. Les échantillons ont été vortexés et refroidis sur de la glace pendant 30 min. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 5 min à 10 000 g. Le surnageant a été recueilli. La quantité d'EB extravasée dans le cortex a été déterminée par spectrophotométrie à 610 nm et exprimée en ng/mg de tissu. La quantité de NaF dans le cortex en µg/g de tissu a été déterminée par fluorométrie (Biotek, Winooski, USA) à une excitation à 485 nm et une émission à 528 nm.

Détermination de l'œdème cérébral

L'œdème cérébral chez les rats BDL a été déterminé avec une technique de gravimétrie spécifique (Marmarou et al., 1978). Brièvement, le cortex préfrontal frais a été disséqué à 4°C et coupé en cubes d'environ 2 mm³. Ces cubes ont été déposés dans une colonne avec un gradient de densité et le point d'équilibre a été noté après 2 min. Les colonnes contenaient une solution de kérosène et bromobenzène. Une solution précalibrée de K₂SO₄ dont la densité était connue a été utilisée comme référence. La moyenne de 8 mesures de densité de chaque cortex préfrontal a été calculée et convertie en pourcentage d'eau selon l'équation décrite dans Marmarou et al. (1978).

Détermination des niveaux d'ammoniaque

Dans le plasma, la concentration d'ammoniaque a été déterminée enzymatiquement par une trousse commerciale (Sigma). L'enzyme L-glutamate déshydrogénase convertit NH₄⁺ avec l'α-kétoglutarate et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) en glutamate. L'oxydation du NADPH lors de cette réaction cause une diminution de l'absorbance à 340 nm et elle est proportionnelle à la concentration de NH₄⁺.

Quantification des niveaux de radicaux libres oxygénés dans le plasma

L'oxydation du diacétate de dichlorofluorescéine (DCFDA; Invitrogen, Carsbald, USA) en dichlorofluorescéine (DCF) (non fluorescente) a été employée pour quantifier le niveau de radicaux libres oxygénés (ROS, majoritairement pour l'hydroxyle et le peroxydant). Le DCFDA est chimiquement oxydé en DCF. En présence de ROS, la DCF devient fluorescente lorsqu'elle est excitée. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la concentration de ROS.

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

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

Préparation des lysats de cortex préfrontal

Le cortex préfrontal a été homogénéisé dans une solution de 50 mM tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Tris) pH 7.5 et 1 mM acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pH 8 (TE 50:1) et du *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) 1:500 (Sigma). Les échantillons ont été centrifugés pendant 40 min à 13 000 g à 4°C et le surnageant résultant (la fraction cytosolique) a été récupéré. Le culot a été suspendu dans du tampon TE et recentrifugé identiquement. Le culot obtenu contenant la fraction membranaire a été resuspendu dans du TE et la quantité de protéine a été mesurée dans les deux fractions selon la méthode de Lowry et al. (1951).

Isolement des microvaisseaux sanguins cérébraux

Le protocole a été adapté à partir de Faropoulos et al. (2010) et Krizbai et al. (2005). D'abord, l'hémisphère droit incluant le cervelet et le tronc cérébral a été homogénéisé dans une solution tampon de sucrose (0.32 M sucrose, 3 mM acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES), PIC (1:500), 50 mM fluorure de potassium (KF) et 10 mM pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)). KF et $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ inhibent les phosphatases de protéines (Areballo et al., 1980; Jaumot et al., 2001). Les tissus homogénéisés ont été centrifugés deux fois pendant 10 min à 1000 g. Le culot obtenu a été centrifugé pendant 30 s à 100 g et une seconde fois pour 15 s à 100 g. Finalement, le culot a été centrifugé trois fois avec du tampon de sucrose à 200 g durant 1 min. Chaque fois, le culot a été resuspendu dans le tampon de sucrose. Les étapes précédentes ont été réalisées à 4°C. Enfin, pour l'immunobuvardage, les microvaisseaux sanguins cérébraux ont été soniqués pendant 20 s (Vibracell, Sonics and Materials Inc, Danbury, USA) dans le tampon de sucrose. La quantité de protéine a été déterminée selon la méthode de Lowry et al. (1951). Pour l'extraction d'acides ribonucléiques, les échantillons ont été soniqués pendant 20 s dans 1 ml de Trizol (Invitrogen).

Immunobuvardage

Le niveau d'expression des protéines β -actine, claudine-5, occludine, zonula occludens-1 (ZO-1), zonula occludens-2 (ZO-2), co-transporteur Na-K-Cl (NKCC1) et la phosphorylation des résidus thréonine du NKCC1 (NKCC1-P) ont été déterminés par immunobuvardage de type Western. Les fractions membranaires cérébrales ont été utilisées pour les protéines des jonctions serrées tandis que les échantillons de microvaisseaux cérébraux ont été utilisés pour le NKCC1 et le NKCC1-P. Des quantités égales de protéines ont été chargées dans les puits de gels de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide* (SDS-PAGE) de 8% (20 μ g, β -actine), 12% (50 μ g, claudin-5), 9% (30 μ g, occludine), 7.5% (60 μ g, ZO-1 et 50 μ g, ZO-2), et 8% (35 μ g, NKCC1 et 45 μ g, NKCC1-P). Le gel a migré pendant 1.5 h à 150 volts (V). Les protéines ont été par la suite transférées sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à 25 V pendant 16 h à 4°C sauf pour ZO-1 (35 V) et incubées dans une solution de 5% de lait écrémé en poudre sans gras dans du *Tris-Buffered Saline Tween-20* (TBS-T, 1 mM Tris, 10 mM NaCl et 0.5% Tween-20) pour 1 h. Ces membranes ont été exposées aux anticorps primaires β -actine (monoclonal de souris, 1/100 000, Sigma), claudine-5 (polyclonal de lapin, 1/500, Invitrogen), occludine (polyclonal de lapin, 1/1000, Invitrogen), ZO-1 (polyclonal de lapin, 1/500, Invitrogen), ZO-2 (polyclonal de lapin, 1/500, Invitrogen), NKCC1 (T4, monoclonal de souris, 1/1000, développé par Dr. Christian Lytle, Université de Californie, Riverside, obtenu du *Developmental Studies Hybridoma Bank* (Université de l'Iowa, USA)) et finalement NKCC1-P (R5, polyclonal de lapin, 1/1000, cadeau du Dr. Biff Forbush, Université Yale, New Haven, USA) pendant 1 h à température de la pièce. L'anticorps R5 a été produit par l'immunisation d'un diphasphopeptide contenant les résidus Thr 212 et 217 du NKCC1 humain faisant parti d'un domaine conservé chez les vertébrés. Les membranes ont été lavées avec du TBS-T trois fois pour 5 min. Puis, les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (anti IgG de lapin, Perkin Elmer, Boston, USA ; anti IgG de souris, 1/10 000, Perkin Elmer) ont été ajoutés pour 1 h. Après 3 lavages avec du TBS-T, les membranes ont été développées avec des réactifs chemiluminescents (GE Healthcare,

Piscataway, USA) et exposées sur des films à rayons X (UXR, Dorval, Canada). Enfin, l'intensité des bandes a été quantifiée par le programme Quantity One (Bio Rad Laboratory, Hercules, USA) et normalisée avec l'intensité des bandes de la protéine β -actine correspondantes. Les expériences d'immunobuvardage ont été répétées deux fois avec des groupes de rats différents.

Évaluation de la carbonylation des chaînes latérales des protéines

La carbonylation des chaînes latérales des protéines des CMV des rats BDL SHAM (n = 4) et BDL (n = 4) a été évaluée par une trousse commerciale (Oxy Blot Protein Oxidative Kit, Millipore, Billerica, USA). Une quantité égale (20 μ g) de protéines de microvaisseaux sanguins a été combinée avec une solution de 12% SDS pour les dénaturer. Du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) a été ajouté aux échantillons pour dériver les groupes carbonyles des chaînes latérales des protéines en DNP. Après 15 minutes, les réactions ont été arrêtées par l'addition d'une solution de neutralisation. Les protéines dérivées ont été séparées par SDS-PAGE. Après un immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-DNP (lapin, 1/150) et ensuite de l'anti-IgG de lapin couplé au HRP (chèvre, 1/300), les dérivés de DNP ont été détectés. L'intensité des bandes a été quantifiée par Quantity One et normalisée avec l'intensité des bandes de la β -actine correspondantes.

Détermination de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP)

Pour l'évaluation de l'activité enzymatique des MMP par zymographie, 20 μ g de lysat cytosolique a été chargé sur un SDS-PAGE 10% contenant 1 mg/ml de gélatine (BioRad Laboratory). Une solution contenant 1.5 ng de métalloprotéinases matricielles (MMP-9 et MMP-2, US Biological, Cleveland, USA) a été chargée sur le gel comme contrôle positif. Après une électrophorèse de 1 h à 200 V, les gels ont été incubés dans un tampon zymogène pour la digestion de la gélatine, contenant 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl et 0.02% Brij35, pendant 40 h à 37°C. Ensuite, les gels ont

été colorés pendant 3 h dans une solution de 0.5% de bleu de Coomassie. Les gels ont été décolorés avec une solution de 10% d'acide acétique et 30% de méthanol jusqu'à l'apparition de bandes. Enfin, les gels ont été numérisés et analysés avec le programme Quantity One. L'activité de la digestion de la gélatine par les MMP-9 et MMP-2 a été détectée par la présence de bandes blanches sur le gel de gélatine.

Extraction d'acide ribonucléique (ARN)

Du chloroforme a été ajouté aux échantillons de microvaisseaux sanguins cérébraux dans le Trizol et les échantillons ont été centrifugés à 13 000 g pendant 45 min à 4°C. La phase aqueuse a été incubée avec de l'isopropanol à -80°C pour 16 h. Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot d'ARN résultant a été lavé avec de l'éthanol 75% et resuspendu dans l'eau additionnée de diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma). La concentration d'ARN a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm.

Transcription Inverse-Amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR)

L'ARN de CMV (1 µg) a été ajouté à du tampon (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl et 0.1 mM dithiothréitol (DTT), Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 0.1 µg/µl d'albumine bovine sérique (BSA, Invitrogen), 0.2 mM de déoxynucléotide triphosphate (dNTP, GE Healthcare). L'ARN a été rétrotranscrit en utilisant la *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase* (M-MLV RT, Invitrogen) avec 1 µM d'amorces sens et anti-sens (Invitrogen) et amplifié par la Taq DNA polymérase (Invitrogen). Les séquences des amorces ont été créées à l'aide de Primer3 et BLAST et sont les suivantes :

Pour le NKCC1 :

sens : 5'-CCAGCCTGGCAGAGCTCCAC-3'

anti-sens : 5'-TCAAGCCAATCGCACCGCCAA-3'

Pour la β-actine :

sens : 5'-GCTACAGCTTCACCACCACA-3'

anti-sens : 5'-TCTCCTTCTGCATCCTGTCA-3'

La rétrotranscription a été menée à 37°C pendant 30 min. La première étape de l'amplification pour le NKCC1 par PCR a été une dénaturation à 95°C pendant 3 min. Les étapes suivantes ont été répétées 20 fois pour le NKCC1 et 16 fois pour β -actine : dénaturation à 95°C pour 30 s, appariement des amorces à 58°C pour 45 s et extension de l'ADN complémentaire à 72°C pour 60 s, suivi d'une extension finale à 72°C pour 10 min. Pour la β -actine, la température du cycle d'appariement a été de 59°C. Les produits de PCR de le NKCC1 (390 paires de bases (pb)) et de β -actine (360 pb) ont été séparés sur des gels séparés de 9% polyacrylamide. Les gels ont été incubés dans de l'eau à laquelle a été ajoutée du bromure d'éthidium (10 μ g/ml). Subséquemment, les bandes ont été visualisées sous UV et analysées avec le programme Quantity One.

Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type à la moyenne (S.E.M). L'importance de la différence a été déterminée à l'aide du programme GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) par le test de Student. Les valeurs de probabilité $p < 0.05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

1. Intégrité de la BHE

Deux modèles d'EH minimale ont été utilisés dans cette étude : la ligature de la voie biliaire (BDL) et l'anastomose portocave (PCA). Dans le modèle BDL, l'œdème cérébral est présent avec une augmentation de l'ammoniaque dans le cerveau et dans le sang (150-250 μM), une élévation du stress oxydatif dans le plasma et une cirrhose du foie. Dans le modèle PCA, il y a une hyperammoniémie de niveau similaire à celle trouvée dans les BDL mais sans cirrhose du foie, sans stress oxydatif et sans œdème cérébral. Les deux modèles ont une augmentation du niveau du NH_3 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) à cause de l'hyperammoniémie (**Figure 18** et **Figure 20**)

L'étude de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans ces deux modèles a permis de définir l'origine de l'œdème cérébral chez les rats BDL puisqu'un œdème vasogénique implique une rupture de la BHE avec une augmentation de la perméabilité aux macromolécules endogènes (albumine sérique) ou exogènes (médicaments) qui, normalement, ne peuvent pas passer la BHE. En parallèle, l'étude chez les rats PCA a permis de déterminer l'effet de l'hyperammoniémie chronique, une condition semblable à celle du modèle BDL, sur la BHE. Trois expériences ont été choisies pour confirmer l'état de la BHE : i) la perméabilité de la BHE; ii) l'expression des protéines des jonctions serrées (JS); iii) l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP).

Expérience 1 : extravasation d'Evans Blue et de fluorescéine de sodium

Premièrement, la perméabilité de la BHE en présence d'un œdème cérébral chez les rats BDL a été évaluée par l'extravasation des macromolécules. Ceci a aussi été fait

chez les rats PCA afin de cerner l'effet de l'hyperammoniémie chronique sur la perméabilité de la BHE.

Deux colorants, l'Evans Blue (EB) et la fluorescéine de sodium (NaF) ont été injectés par voie intraveineuse (i.v) et leur présence dans les tissus cérébraux a été détectée par spectrophotométrie et fluorométrie respectivement. Le colorant EB (961 Da) se lie à l'albumine dans le plasma et forme alors une macromolécule plus imposante tandis que NaF (376 Da) est une molécule de plus petite taille. Leur extravasation hors des capillaires et leur présence dans les tissus cérébraux indiquent l'ampleur de la rupture de la BHE. La **Figure 21** reflète l'absence d'extravasation d'EB et de NaF des capillaires vers les tissus cérébraux chez les rats BDL et PCA.

Puisque qu'il n'y avait pas de détection, un contrôle positif a été nécessaire pour valider les méthodes. Le mannitol a été sélectionné parce qu'une concentration élevée de ce polyol cause un impact osmotique menant à une perte graduelle de l'intégrité de la BHE (Kozler, 2003). Injecté directement vers le cerveau par l'artère carotide, le niveau toxique de mannitol augmente l'hypertonie du plasma. Celle-ci a pour effet d'attirer l'eau des cellules endothéliales vers le sang, de causer le rétrécissement des cellules endothéliales de la BHE et en conséquence, de permettre le passage des macromolécules. L'EB et le NaF ensuite injectés peuvent alors diffuser paracellulairement. Avec le traitement du mannitol, 62 ng/mg de tissu d'EB et 7 µg/g de tissu de NaF du cortex cérébral ont été détectés.

Puisque l'extravasation de ces colorants n'a pas été détectée chez nos rats cirrhotiques, nous avons conclu que la perméabilité aux macromolécules de la BHE n'est pas augmentée en présence d'œdème cérébral (BDL). De plus, elle reste inchangée lors d'une hyperammoniémie chronique seule (PCA).

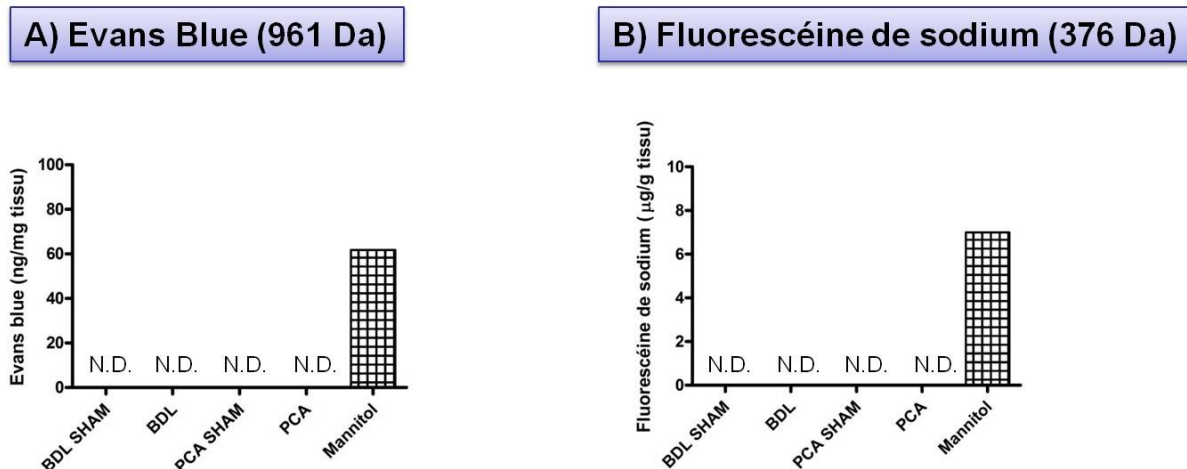


Figure 21. Extravasation d'EB et de NaF dans le cortex cérébral des rats BDL et PCA Par spectrophotométrie et fluorométrie, l'extravasation d'EB (A) et de NaF (B) dans le cortex a été non-déetectable (N.D.) chez les rats BDL SHAM (n=7), BDL (n=5), PCA SHAM (n=8) et PCA (n=5). Comme contrôle positif, une concentration toxique de mannitol a induit l'extravasation d'EB et de NaF dans le cortex cérébral.

Expérience 2a : expression des protéines transmembranaires des JS

Deuxièmement, une étude des protéines transmembranaires des jonctions serrées (JS) a été effectuée. Les JS sont composées des protéines transmembranaires claudine-5 et occludine qui scellent l'espace paracellulaire et ainsi limitent la diffusion de macromolécules vers le SNC. Or, une augmentation de la perméabilité de la BHE est associée à une réduction de l'expression des protéines des JS, dont la claudine-5 et l'occludine (Ishrat, 2010; Sandoval, 2008). L'expression des protéines transmembranaires des JS a été évaluée afin de confirmer l'état de la BHE par immunobuvardage de type Western lors d'un œdème cérébral (rats BDL). Ceci a aussi été fait pour déterminer l'effet d'une hyperammoniémie chronique (rats PCA) sur l'intégrité des JS.

Provenant du cortex préfrontal, des lysats de fraction membranaire ont été utilisés. À la **Figure 22**, le changement dans l'expression relative de claudine-5 chez les rats BDL SHAM (1.13 ± 0.29) contre les rats BDL (2.07 ± 0.71) n'a pas été significatif. Chez les rats PCA SHAM (2.30 ± 0.51) par rapport aux PCA (2.19 ± 1.22), l'expression relative de claudine-5 n'a pas varié significativement. À la **Figure 23**, ce même résultat a aussi été observé pour l'occludine. Les expériences d'immunobuvardage chez les rats BDL SHAM (0.79 ± 0.21) et BDL (2.86 ± 1.40) ont aussi démontré aucune variation significative de l'expression d'occludine dans le cortex préfrontal. Enfin, chez les rats PCA SHAM (0.49 ± 0.13) et PCA (0.25 ± 0.04), l'expression d'occludine n'a pas fluctué significativement.

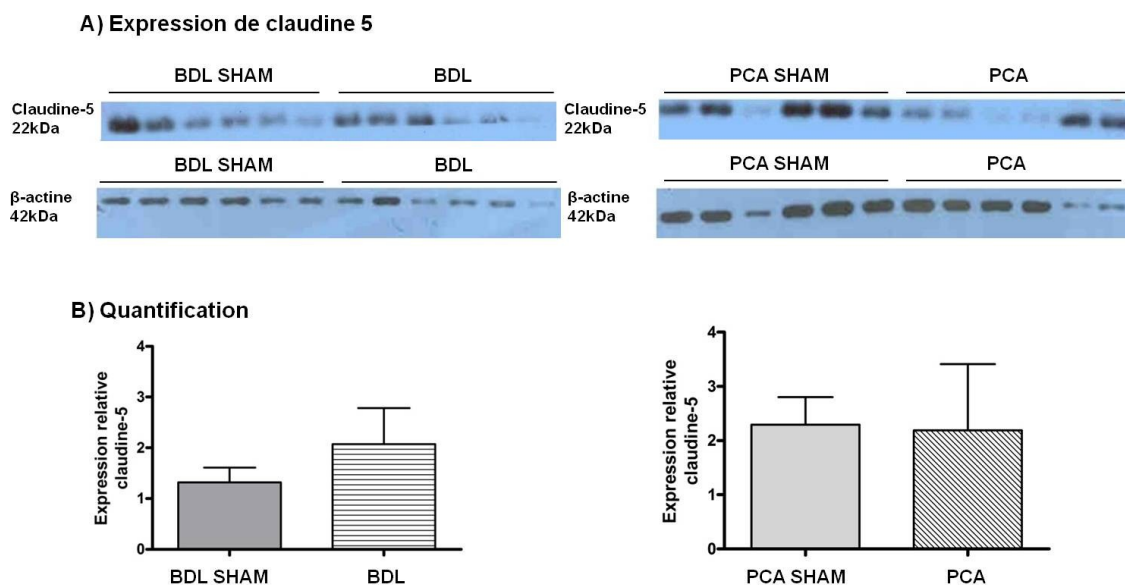
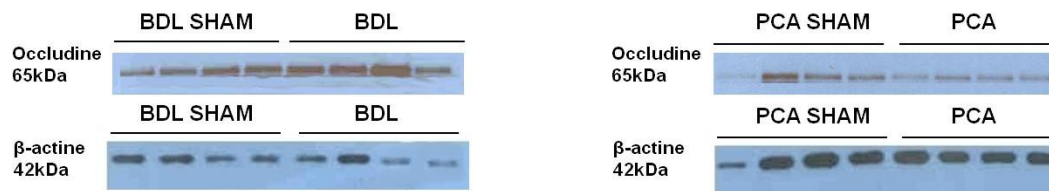


Figure 22. L'expression relative de la protéine membranaire intégrale claudine-5 chez les rats BDL et PCA dans le cortex préfrontal

Déterminée par immunobuvardage, l'expression relative de claudine-5 n'a pas changé significativement chez les rats BDL SHAM ($n = 6$) contre les rats BDL ($n = 6$). Chez les rats PCA SHAM ($n = 6$) et PCA ($n = 6$), ce même résultat a été observé. L'expression relative a été calculée par la densité des bandes de claudine-5 normalisée avec celle des bandes correspondantes de β -actine. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

A) Expression d'occludine



B) Quantification

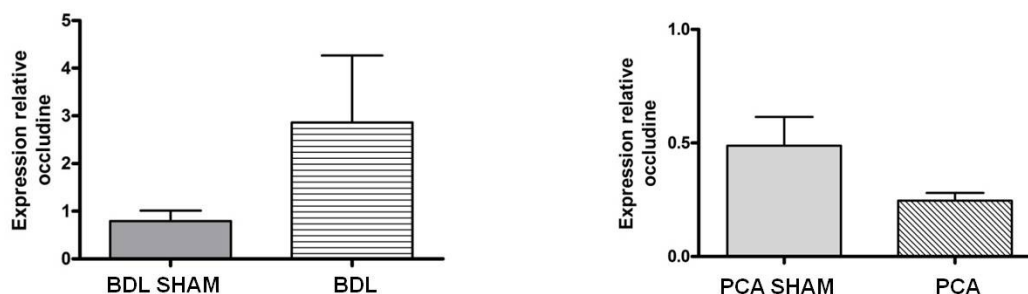


Figure 23. L'expression relative de la protéine membranaire intégrale occludine chez les rats BDL et PCA dans le cortex préfrontal

Déterminée par immunobuvardage, l'expression relative d'occludine n'a pas changé significativement chez les rats BDL SHAM ($n = 4$) contre les rats BDL ($n = 4$) dans le cortex préfrontal. Chez les rats PCA SHAM ($n = 4$) et PCA ($n = 4$), ce même résultat a été observé dans la même région spécifique. L'expression relative a été calculée par la densité des bandes d'occludine normalisée avec celle des bandes correspondantes de β -actine. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Expérience 2b : expression des protéines d'échafaudages des JS

ZO-1 et ZO-2 sont des protéines cytoplasmiques qui lient les extrémités terminales cytoplasmiques des protéines intégrales de la membrane claudine-5 et occludine et jouent un rôle critique dans la stabilité des complexes des JS (Hawkins, 2005). Une variation des niveaux des protéines cytoplasmiques des JS peut affecter la perméabilité de la BHE (Shimajima, 2008).

Provenant du cortex préfrontal, des lysats de fraction membranaire ont été utilisés étant donné que les ZO-1 sont des protéines d'échafaudage liées aux protéines transmembranaires (claudine-5 et occludine) À la **Figure 24**, il n'y a pas eu de

changement significatif dans l'expression relative de ZO-1 chez les rats BDL SHAM (1.41 ± 0.29) contre les rats BDL (1.21 ± 0.28). Chez les rats PCA SHAM (0.59 ± 0.18) et PCA (1.52 ± 0.97), la variation dans l'expression relative de ZO-1 n'a pas été significative. À la **Figure 25**, pour la protéine ZO-2, aucune modification a été notée dans son expression relative chez les rats BDL SHAM (2.18 ± 0.35) contre les rats BDL (1.77 ± 0.44). Enfin, il en a été de même pour les rats PCA SHAM (1.41 ± 0.50) et PCA (0.69 ± 0.12).

Cela suggère que la perméabilité de la BHE chez les rats BDL ne varie pas parce que l'expression des protéines des JS n'a pas changé malgré l'œdème cérébral. L'expression des protéines membranaires intégrales et d'échafaudage des JS de la BHE n'a pas été influencée par l'hyperammoniémie chez les rats PCA. Il est juste de dire que la stabilité des JS est maintenue malgré l'œdème dans le cortex cérébral.

A) Expression de ZO-1



B) Quantification

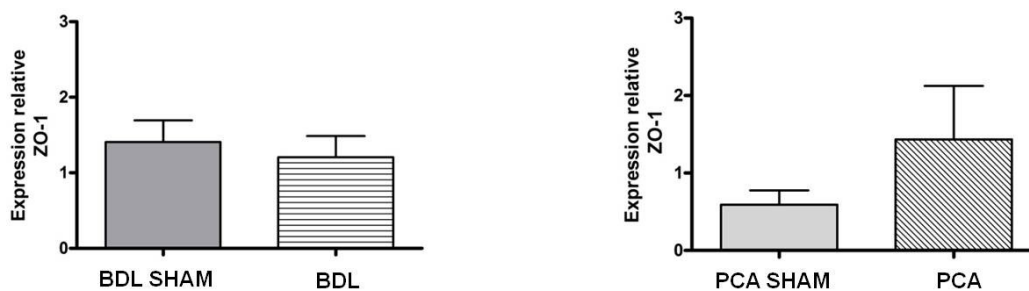


Figure 24. L'expression relative de la protéine cytoplasmique ZO-1 chez les rats BDL et les rats PCA dans le cortex préfrontal

Déterminée par immunobuvardage, l'expression relative de ZO-1 n'a pas été modifiée significativement chez les rats BDL SHAM ($n = 4$) et les rats BDL ($n = 4$). Pareillement, l'expression relative de ZO-1 chez les rats PCA SHAM ($n = 4$) et les rats PCA ($n = 4$) n'a pas divergé significativement. L'expression relative a été calculée à partir de la densité des bandes de ZO-1 normalisées avec celle des bandes correspondantes de β -actine. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

A) Expression de ZO-2



B) Quantification



Figure 25. L'expression relative de la protéine cytoplasmique ZO-2 chez les rats BDL et les rats PCA dans le cortex préfrontal

Déterminée par immunobuvardage, l'expression relative de ZO-2 n'a pas été altérée significativement chez les rats BDL SHAM ($n = 4$) et les rats BDL ($n = 4$). Pareillement, l'expression relative de ZO-2 chez les rats PCA SHAM ($n = 4$) et les rats PCA ($n = 4$) n'a pas différé significativement. L'expression relative a été calculée à partir de la densité des bandes de ZO-2 normalisées avec celle des bandes correspondantes de β -actine. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Expérience 3 : activité de MMP-9 et MMP-2

Troisièmement, l'activité des MMP a été étudiée. Les MMP sont des marqueurs de rupture de la BHE (œdème vasogénique) dans plusieurs conditions pathologiques (Gasche et al., 1999; Ishrat, 2010; Nguyen, 2006; Shigemori, 2006). Ce mécanisme requiert une dégradation de la matrice extracellulaire où reposent les cellules endothéliales et, ainsi augmente la perméabilité de la BHE. L'activité enzymatique des MMP-9 et MMP-2 a été quantifiée pour confirmer l'état de la BHE dans les deux modèles expérimentaux. La MMP-9 est principalement exprimée par les cellules endothéliales lorsque la MMP-2 est exprimée particulièrement aux prolongements des astrocytes (Candelario-Jalil, 2009).

Pour évaluer la perméabilité de la BHE, l'activité des MMP a été étudiée par zymographie dans le cortex préfrontal chez les modèles BDL et PCA. Les MMP dégradent la gélatine contenue dans le gel et cela crée une bande (régions de gélatine digérée). L'intensité de la bande corrèle avec l'activité digestive de l'enzyme. Utilisée comme contrôle positif, la solution étalon de MMP-9 et MMP-2 a donné 3 bandes dans le gel. La première bande à 180 kDa correspond à la forme proenzymatique de MMP-9 tandis que la deuxième bande à 94 kDa correspond à MMP-9. La troisième bande à 68 kDa correspond à MMP-2. À la **Figure 26**, l'activité enzymatique a été non-délectable tant chez les rats BDL que les rats PCA puisqu'il n'y a pas de bandes notables dans les puits du gel de gélatine. Cela suggère que les MMP ne sont pas activées. Donc, les MMP-9 et MMP-2 ne sont pas activées lors de l'œdème cérébral chez les rats BDL. L'hyperammoniémie chronique seule chez les rats PCA n'active pas MMP-9 et MMP-2.

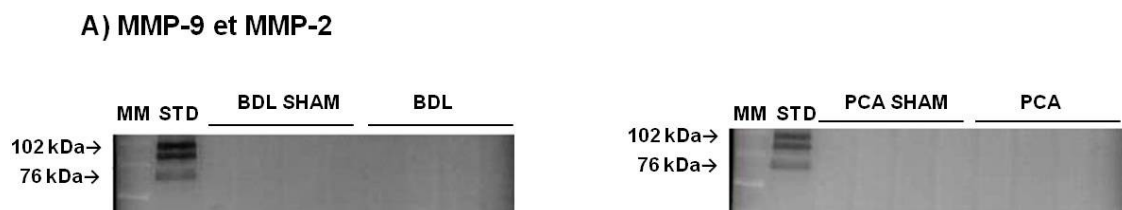


Figure 26. L'activité enzymatique des MMP dans le cortex préfrontal chez les rats BDL et les rats PCA

Déterminée par zymographie, l'activité de MMP-9 et MMP-2 n'a pas été observée chez les rats BDL SHAM ($n = 4$), BDL ($n = 4$), PCA SHAM ($n = 4$) et PCA ($n = 4$) étant donné l'absence de bandes. Le premier puits contient les marqueurs moléculaires (MM). Dans le puits des standards (STD), la bande la plus haute (180 kDa) correspond à la proforme de MMP-9. La deuxième bande à 98 kDa correspond à MMP-9 et la bande la plus basse (68 kDa) représente MMP-2. Des fractions cytosoliques ont été utilisées pour cette expérience.

Donc, dans les deux modèles d'EH minimale, il n'y a pas de rupture de la BHE. Chez les rats BDL, l'extrasation de macromolécules est absente et alors il n'y a pas de changement dans la perméabilité de la BHE aux molécules qui normalement ne la traversent pas. En plus, l'expression des protéines des JS ne varie pas et les MMP ne

sont pas activées. Cela confirme que l'intégrité de la BHE chez les rats BDL est conservée malgré l'œdème cérébral. Chez les rats PCA, ces mêmes conclusions sont obtenues et signifient que l'hyperammoniémie chronique (une condition présente chez les rats BDL) n'endommage pas la BHE : la perméabilité ne varie pas, l'intégrité des JS est conservée et il n'y a pas d'activation des MMP-9 et MMP-2. Avec ces trois résultats chez les rats BDL, le premier objectif a été atteint : l'origine de l'œdème cérébral a été définie comme étant cytotoxique puisque l'intégrité de la BHE est conservée, excluant la possibilité d'un œdème vasogénique. Enfin, ces trois mêmes conclusions sur l'intégrité de la BHE ont été faites chez les PCA. Elles permettent de répondre au deuxième objectif : l'hyperammoniémie chronique, qui mène à une augmentation de la concentration du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans le LCR, n'affecte pas la BHE.

2. Rôle du NKCC1 dans la pathogenèse de l'œdème cérébral

Puisque que les résultats précédents démontrent que l'œdème cérébral n'est pas de type vasogénique, la prochaine étape sera d'étudier son mécanisme cytotoxique. Les protéines de la BHE impliquées dans le transport des ions et la régulation du volume cellulaire comme le co-transporteur Na-K-Cl (NKCC) deviennent une avenue intéressante pour l'étude. L'isoforme 1 est ubiquitaire (NKCC1). Il transporte un ion de Na^+ et de K^+ avec 2 ions de Cl^- . Ces ions sont en général transportés à l'intérieur de la cellule dépendamment des gradients de ces trois ions (Haas et al., 1998). Le NKCC1 peut transporter les ions de NH_4^+ (Kelly, 2010) et il est impliqué dans la pathogenèse de l'œdème cérébral dans des modèles d'ischémie cérébrale (Chen et al., 2005a; O'Donnell, 2004b). De plus, quelques études proposent que le stress oxydatif puisse augmenter son activité, ce qui modifierait l'homéostasie ionique (Jayakumar, 2011).

Traitement avec la bumétanide et œdème cérébral

Si le NKCC1 est impliqué dans l'œdème cytotoxique chez les rats BDL, une inhibition de son activité préviendrait l'augmentation d'eau dans le cerveau. Pour vérifier cette hypothèse, la bumétanide (BUM), un inhibiteur de NKCC en se liant au site du Cl⁻ (Haas et al., 1983), a été choisie. De plus, la BUM ne traverse pas la BHE (O'Donnell et al., 2004a). Alors, la BUM n'affecte que les protéines du côté luminal des capillaires et n'atteint pas le NKCC1 sur les astrocytes ou les neurones.

Les résultats du traitement avec la BUM se trouvent à la **Figure 27**. Le pourcentage d'eau dans les cerveaux chez les rats BDL non-traités ($78.89 \% \pm 0.25$) était significativement plus élevé comparativement aux rats BDL SHAM non-traités ($78.12 \% \pm 0.21$). Lorsque les rats ont été traités par une injection quotidienne par voie intrapéritonéale (i.p) de 10 mg/kg de BUM pendant 10 jours, l'œdème cérébral chez les rats BDL + BUM ($77.35 \% \pm 0.18$) a été atténué comparé aux rats BDL non-traités ($78.89\% \pm 0.25$). De plus, le pourcentage d'eau chez les rats BDL + BUM est devenu similaire à celui des rats BDL SHAM + BUM ($77.66 \% \pm 0.16$). Alors, le traitement avec la BUM prévient le développement de l'œdème cérébral chez les rats BDL.

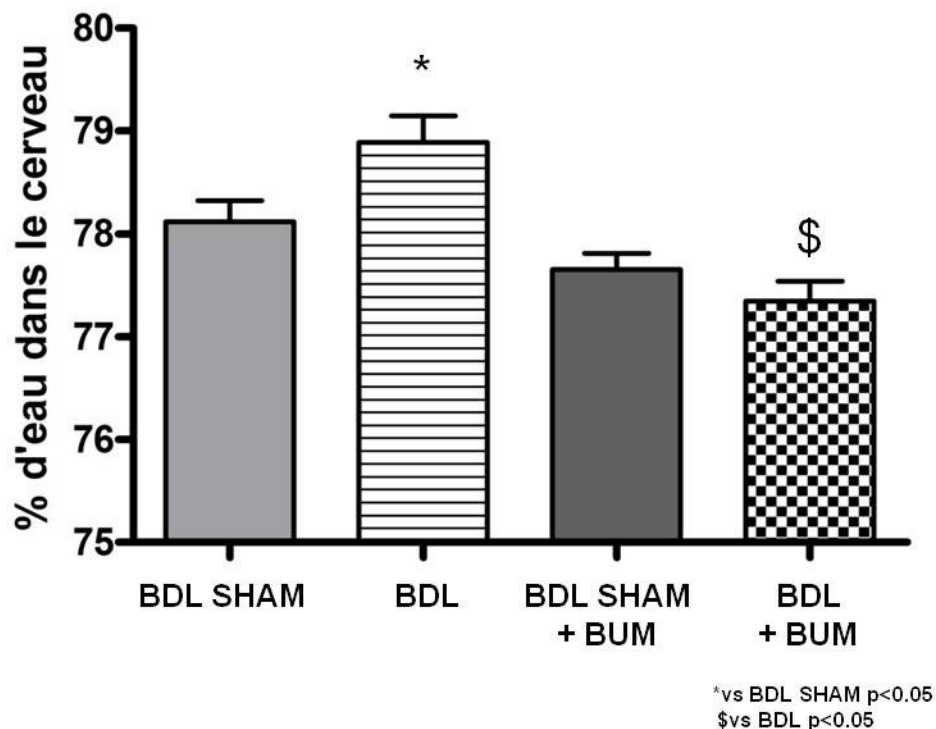


Figure 27. Quantité d'eau dans le cortex cérébral chez les rats BDL et les rats BDL traités avec de la BUM

Une hausse du pourcentage d'eau cérébral chez les rats BDL ($n = 6$) comparé aux rats BDL SHAM ($n = 6$) a été déterminée par une technique de gravimétrie spécifique. Lorsque le traitement avec la BUM a été administré, l'augmentation du pourcentage d'eau dans le cerveau des rats BDL SHAM ($n = 6$) et BDL ($n = 6$) n'a plus été significativement différente. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Isolement des microvaisseaux sanguins cérébraux

Le traitement avec la BUM, un inhibiteur du NKCC1, a atténué l'œdème cérébral. Alors, le rôle du NKCC1 dans l'œdème cérébral a été examiné. Étant donné que la BUM ne passe pas la BHE efficacement, l'effet de l'inhibition du NKCC1 est plus important sur les transporteurs se trouvant sur le côté luminal des microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV) que ceux dans le SNC (abluminal, neurones et astrocytes). Il a aussi été prouvé que les NKCC1 des CMV jouent un rôle dans le développement de l'œdème cérébral durant l'ischémie (O'Donnell, 2004a; O'Donnell, 2004b). Puisque

l'ion NH_4^+ peut substituer le K^+ et être transporté par le NKCC1 (Kelly, 2010), celui-ci pourrait agir de porte d'entrée possible sur la BHE pour l'ammoniaque dans le SNC. À la lueur de ces faits, l'étude du NKCC1 a été dirigée vers les CMV. Ils ont été isolés du cerveau par un protocole de centrifugation dans un tampon de sucrose. Cela a permis d'étudier seulement les NKCC1 des CMV de l'hémisphère cérébral (incluant ceux du cervelet et du tronc cérébral) et sans les NKCC1 des neurones ou astrocytes. Les CMV isolés sont présentés à la **Figure 28**. Par immunobuvardage de type Western, la présence d'occludine et de ZO-2 a été détectée et a confirmé que ce sont des CMV.

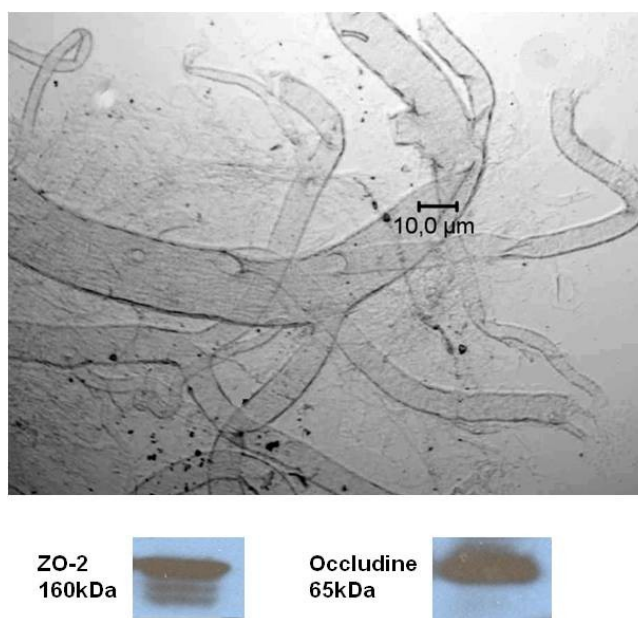


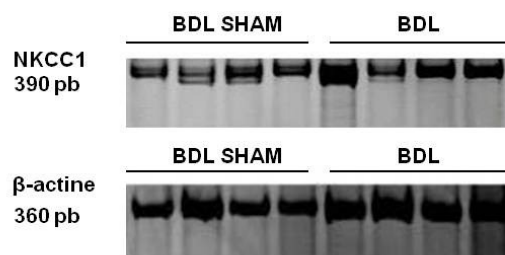
Figure 28. Les microvaisseaux sanguins cérébraux isolés à partir d'un protocole de centrifugation
Image de CMV prise par microscopie optique (grossissement 40X). La présence des protéines ZO-2 et d'occludine a confirmé la purification de CMV, isolés à partir de l'hémisphère cérébral, du cervelet et du tronc cérébral.

Expression de l'ARNm du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL

Dans les CMV, le niveau d'expression de l'ARNm du NKCC1 a été analysé en premier lieu afin de déterminer si son expression génique est perturbée par l'œdème cérébral chez les rats BDL.

Le niveau d'ARNm a été déterminé par RT-PCR dans les CMV isolés par un protocole de centrifugation. À la **Figure 29**, chez les BDL ($243.90 \% \pm 53.53$), il y a eu une augmentation de l'expression relative d'ARNm codant pour le NKCC1 de 2.4 fois comparé aux BDL SHAM ($100.00 \% \pm 10.94$). Ainsi, il y a une augmentation d'expression d'ARNm codant pour le NKCC1. De plus, cela donne une deuxième piste suggérant que le NKCC1 soit impliqué dans l'œdème cérébral chez le modèle BDL.

A) ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux



B) Quantification

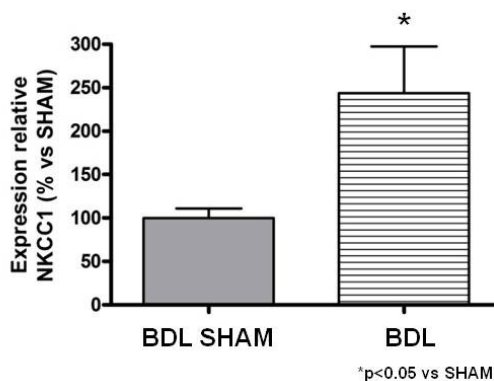


Figure 29. Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux cérébraux chez les rats BDL

Il y a eu une augmentation de l'expression relative d'ARNm du NKCC1 évaluée par RT-PCR chez les rats BDL ($n = 4$) comparé aux rats BDL SHAM ($n = 4$). L'expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes du NKCC1 avec celle des bandes de β -actine correspondantes et en la normalisant ensuite avec les rats BDL SHAM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

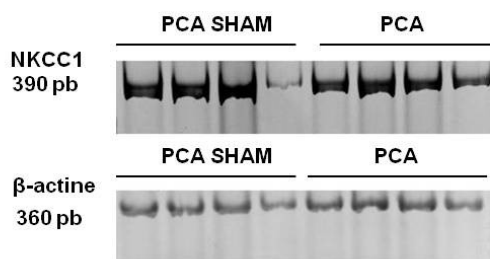
Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats PCA

L'hyperammoniémie occupe une place importante dans la pathogenèse de l'EH minimale. Il est nécessaire de bien comprendre ses effets. Sa contribution à la modulation du NKCC1 et son rôle dans l'œdème cérébral ont été questionnés parce qu'une augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 a été observée chez les rats BDL, qui présentent aussi l'hyperammoniémie chronique. Le modèle PCA a été utilisé puisque l'hyperammoniémie observée est de même envergure (150-250 μ M), toutefois

sans la présence d'œdème cérébral ou d'autres facteurs pathogéniques. La comparaison des 2 modèles a permis de comprendre la relation entre l'hyperammoniémie et l'augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 et à discriminer les effets des autres facteurs chez les rats BDL.

Le niveau d'ARNm codant pour le NKCC1 a été analysé par RT-PCR dans les CMV des rats PCA. À la **Figure 30**, aucune différence significative a été décelée dans l'expression relative de l'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats PCA SHAM ($100.30\% \pm 30.49$) contre les rats PCA ($89.38\% \pm 13.55$). Alors, l'hyperammoniémie chronique seule n'influence pas les niveaux d'ARNm codant pour le NKCC1.

A) ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux



B) Quantification

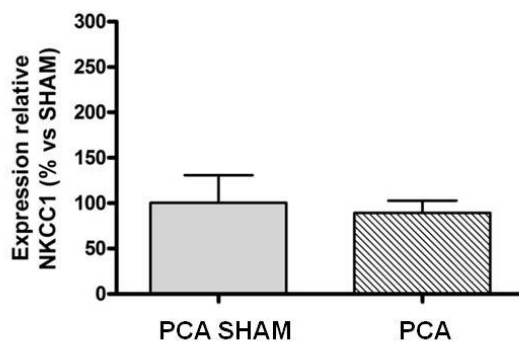


Figure 30. Expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux cérébraux chez les rats PCA

Il n'y a pas de changement significatif dans l'expression relative de l'ARNm codant pour le NKCC1 évaluée par RT-PCR chez les rats PCA ($n = 4$) comparé aux rats PCA SHAM ($n = 4$). L'expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes du NKCC1 avec celle des bandes de la β -actine correspondantes et ensuite en la normalisant avec les SHAM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

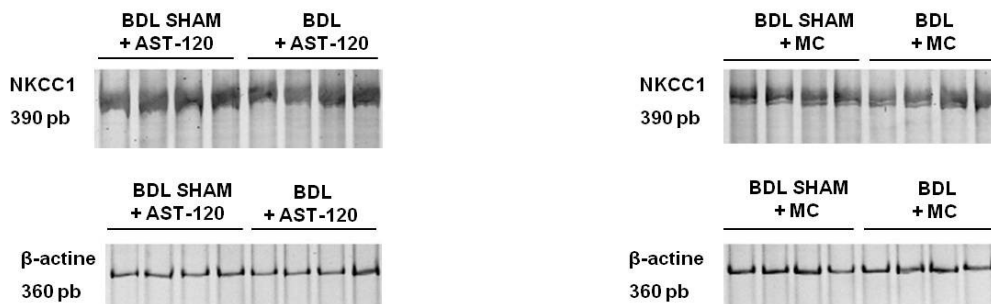
Traitement avec l'AST-120 et expression de l'ARNm codant pour le NKCC1

Afin de mieux comprendre le rôle du NKCC1 dans la pathogenèse de l'œdème cérébral chez les rats BDL, l'effet de la réduction de l'œdème par l'AST-120 sur le NKCC1 a été déterminé. Cela a aidé dans l'identification du facteur causant l'augmentation de l'expression d'ARNm codant pour le NKCC1 avec l'œdème cérébral chez les rats BDL. L'AST-120 est des microsphères de charbon (0.2-0.4 mm) à surface

adsorbante non-spécifique (1600 m²/g). Il est administré oralement par gavage aux rats BDL. Il a été prouvé que l'AST-120 prévient l'œdème cérébral chez les rats BDL (Bosoi, 2011a).

Les résultats du traitement avec de l'AST-120 chez les rats BDL sont à la **Figure 31**. L'ARNm du NKCC1 a été évalué chez des rats traités avec l'AST-120 par RT-PCR. Dans le groupe gavé avec de la méthylcellulose (véhicule), on note une augmentation significative de 24 % de l'expression relative d'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL (124.50 ± 3.45 %) comparés aux rats BDL SHAM (100.30 ± 7.50 %). Grâce au gavage d'AST-120, le changement d'expression relative de l'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL + AST-120 (66.48 ± 13.90 %) n'a pas été significatif comparé aux rats SHAM + AST-120 (100.00 ± 16.49 %). Ainsi, le traitement avec l'AST-120 atténue l'augmentation d'expression d'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL. Alors, ceci suggère une association entre le NKCC1 et l'œdème cérébral chez les rats BDL. Puisque AST-120 diminue aussi le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en parallèle, il y a possiblement une relation entre $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ et le NKCC1.

A) ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux



B) Quantification

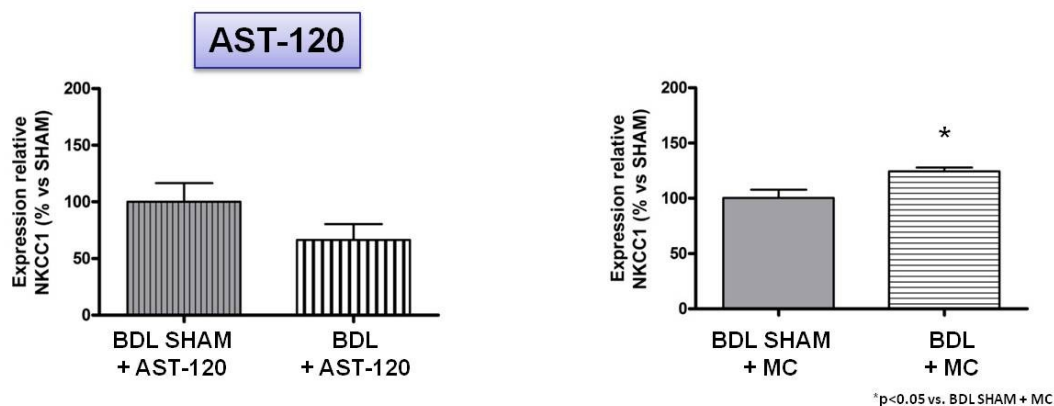


Figure 31. Effet de l'administration de l'AST-120 sur l'expression de l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux

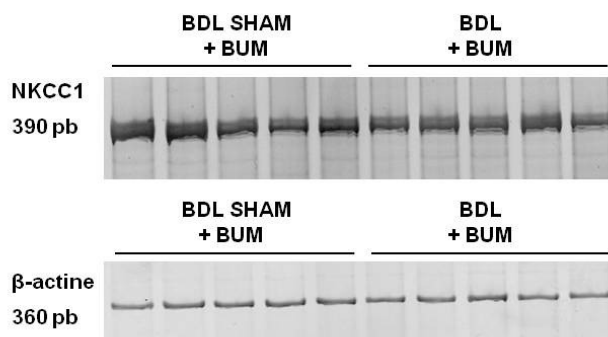
La RT-PCR ci-contre montre que l'expression relative d'ARNm codant pour le NKCC1 a significativement augmenté chez les rats BDL ($n = 4$) contre les rats BDL SHAM ($n = 4$) qui ont été gavés avec de la méthylcellulose (droite). Lorsque les rats ont été gavés avec l'AST-120 (gauche), l'augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 n'a plus été significative chez les rats BDL ($n = 4$) contre BDL SHAM ($n = 4$). L'expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes du NKCC1 avec celle des bandes de la β -actine correspondantes et ensuite en la normalisant avec les SHAM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Traitement avec BUM et expression d'ARNm codant pour le NKCC1

Il a été prouvé que l'AST-120 diminue l'œdème cérébral des rats BDL (Bosoi, 2011a). Dans cette présente étude, l'AST-120 a atténué l'élévation de transcription du gène du NKCC1 dans les CMV et la BUM a atténué l'œdème cérébral chez les rats BDL. Comme l'AST-120, il est possible que la BUM atténue la surexpression de l'ARNm codant pour le NKCC1 et diminue en parallèle l'œdème. Pour mieux élucider le mécanisme de réduction de l'œdème par la BUM et prouver l'implication du NKCC1 dans la pathogenèse de l'œdème, l'expression d'ARNm codant pour le NKCC1 a été examinée par RT-PCR dans les CMV.

La variation d'expression relative d'ARNm codant pour le NKCC1 n'a pas été significativement différente chez les rats BDL (72.78 ± 19.11 %) comparé aux rats BDL SHAM (100.30 ± 7.30 %) traités avec de la BUM (**Figure 32**). Alors, tout comme avec le traitement d'AST-120, l'administration de BUM a réduit l'œdème (**Figure 27**) et a normalisé l'expression d'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL. Il en est conclu que l'œdème cérébral est associé à la régulation génique du NKCC1 dans les CMV. Cette relation a été observée autant avec la BUM que l'AST-120.

A) ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux



B) Quantification

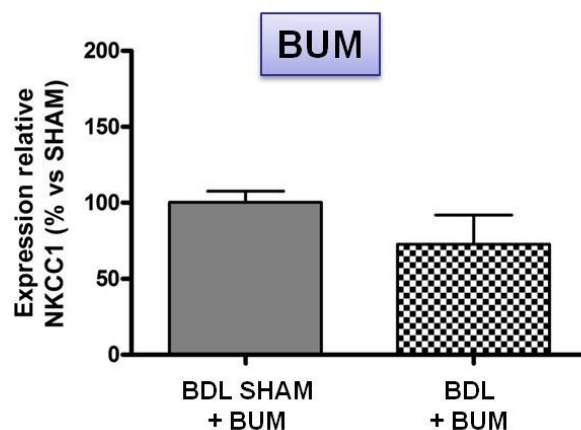


Figure 32. L'expression génique du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux des rats BDL lors d'une administration de BUM

L'expression génique du NKCC1 n'a pas varié chez les rats BDL ($n = 5$) comparé aux rats BDL SHAM ($n = 5$) lorsqu'ils ont été traités avec de la BUM tel que mesuré par RT-PCR. L'expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes du NKCC1 avec celle des bandes de la β -actine correspondantes et ensuite en la normalisant avec les SHAM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

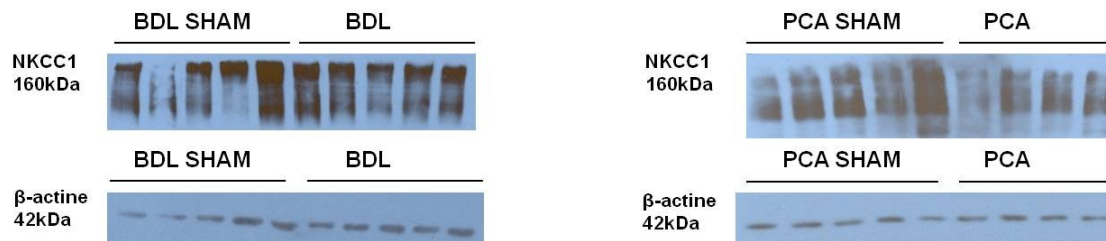
Expression protéique du NKCC1

Une vérification de la corrélation entre l'augmentation d'ARNm et l'expression protéique du NKCC1 a été effectuée dans les CMV. En effet, une augmentation de l'expression protéique du NKCC1 mène à une augmentation de transport de K^+ (Jayakumar, 2011). Alors, il est responsable du transport excessif d'ions à l'intérieur de

la cellule menant à un œdème cytotoxique. L'expression du co-transporteur a donc été étudiée par immunobuvardage dans les CMV.

La variation de l'expression relative de la protéine NKCC1 chez les rats BDL (84.20 ± 8.20 %) n'a pas été significative comparée aux rats BDL SHAM (100.00 ± 14.05 %) (**Figure 33**). Chez les rats PCA (141.40 ± 20.23 %), le changement dans l'expression du NKCC1 n'a pas été significatif comparé aux rats PCA SHAM (100.00 ± 8.00 %) (**Figure 33**). Alors, l'expression protéique du NKCC1 n'est pas associée à un œdème cérébral chez les rats BDL et à l'hyperammoniémie chronique chez les rats PCA. En résumé, il y a une augmentation d'ARNm du NKCC1 chez les rats BDL mais pas d'augmentation au niveau des protéines du NKCC1 dans les CMV tandis que chez les rats PCA, il n'y a pas de changement dans l'expression de l'ARNm ni de la protéine.

A) Expression du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux.



B) Quantification

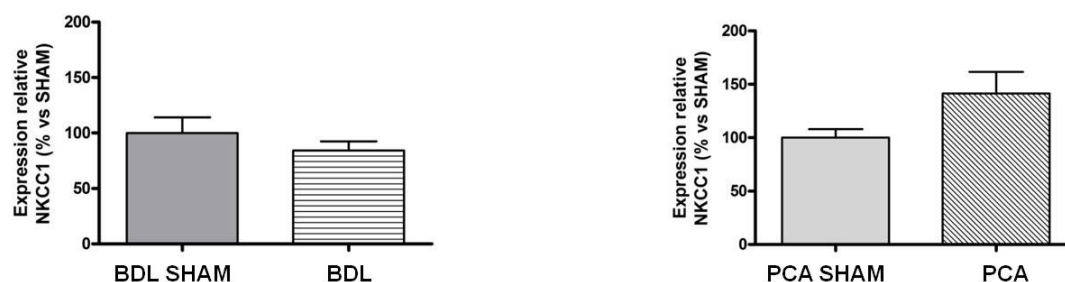


Figure 33. Le niveau d'expression protéique du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL et les rats PCA

L'analyse de l'expression relative du NKCC1 par immunobuvardage a révélé qu'il n'y avait aucun changement significatif chez les rats BDL SHAM ($n = 5$) et rats BDL ($n = 5$). Ceci a aussi été observé chez les rats PCA SHAM ($n = 5$) et les rats PCA ($n = 4$). L'expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes du NKCC1 avec celle des bandes de la β -actine correspondantes. Les données ont ensuite été normalisées avec celles des SHAM correspondants. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Phosphorylation du NKCC1

Une augmentation de l'activité du NKCC1 a été associée à une augmentation du volume cellulaire des astrocytes (Jayakumar, 2011). La phosphorylation du NKCC1 a été étudiée chez les rats BDL puisque celle-ci est nécessaire à son activation (Kahle, 2010). L'anticorps utilisé détecte la phosphorylation des résidus thréonine 212 et 217 qui sont importants à l'activation du NKCC1 (Flemmer, 2002).

Dans les CMV, la phosphorylation des résidus de thréonine du NKCC1 (NKCC1-P) n'a pas significativement varié chez les rats BDL SHAM (1.59 ± 0.21) et

les rats BDL (1.73 ± 0.28) (**Figure 34**). Cela confirme que chez les rats BDL, la phosphorylation des résidus de thréonine du NKCC1 ne change pas. Le ratio entre l'expression du NKCC1 et sa phosphorylation n'a pas varié entre les rats BDL SHAM et les rats BDL (résultats non-montrés). Alors, ces résultats répondent au troisième objectif du projet : l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation du NKCC1 ne sont pas des mécanismes jouant un rôle dans le développement de l'œdème cérébral chez les rats BDL.

A) Phosphorylation relative du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux.



B) Quantification

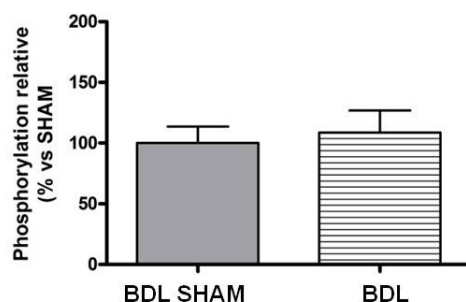


Figure 34. La phosphorylation du NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL

Aucun changement significatif de la phosphorylation des résidus thréonine du NKCC1 n'a été observé chez les rats BDL SHAM ($n = 5$) et les rats BDL ($n = 5$) par immunobuvardage. La phosphorylation a été calculée à partir de la densité des bandes du NKCC1-P normalisées avec celle des bandes de la β -actine correspondantes. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

En résumé, l'œdème cérébral chez les rats BDL a été atténué par un traitement à la BUM. Une augmentation de la transcription du gène du NKCC1 a été remarquée chez les rats BDL mais pas chez les rats PCA. Cette augmentation a été atténuée par le traitement avec l'AST-120 et la BUM. Toutefois, l'élévation des niveaux d'ARNm du NKCC1 ne corrèle pas avec son expression protéique et il n'y a pas de corrélation entre la phosphorylation de la protéine et l'œdème cérébral.

3. Rôle du NH₃ dans l'œdème cérébral

Le niveau du NH₃ plasmatique lors d'un traitement avec la BUM

L'hyperammoniémie est un élément important dans la pathogenèse de l'EH minimale (Butterworth, 2002). Il a été démontré que l'AST-120 atténue l'œdème cérébral. Toutefois, il diminue aussi l'hyperammoniémie chez les rats BDL (Bosoi, 2011a). Nos résultats ont aussi démontré que la BUM atténue l'œdème et diminue la transcription génique du NKCC1, tout comme l'AST-120. Une vérification du niveau du NH₃/NH₄⁺ plasmatique chez les rats BDL traités avec de la BUM a été effectuée afin de tester l'implication du NH₃/NH₄⁺ dans la diminution de l'œdème cérébral par la BUM et de déterminer si ce traitement a un effet similaire à celui de l'AST-120 sur la concentration plasmatique du NH₃/NH₄⁺.

À la **Figure 35**, les rats BDL (103.60 μM ± 16.97) ont une concentration de NH₄⁺ dans le plasma significativement plus haute que les rats BDL SHAM (37.23 μM ± 13.06). Le niveau de NH₄⁺ trouvé chez les rats BDL + BUM (50.53 μM ± 16.37) similaire comparé aux rats BDL SHAM + BUM (51.86 μM ± 12.68). Alors, la BUM réduit l'hyperammoniémie des rats BDL et l'œdème cérébral, un effet comparable au traitement d'AST-120 (Bosoi, 2011a).

L'AST-120 diminue l'hyperammoniémie et cet effet a été associé à une atténuation de l'œdème cérébral (Bosoi, 2011a). La BUM génère les mêmes résultats et prouve que l'hyperammoniémie joue un rôle central dans le développement de l'œdème chez les rats BDL. Cependant, l'hyperammoniémie seule, chez les PCA, n'influence pas le niveau d'ARNm codant pour le NKCC1 (**Figure 30**). Cela suggère que le NH₃/NH₄⁺ seul ne peut pas moduler l'expression génique du NKCC1 et qu'il pourrait y avoir un autre facteur impliqué avec l'hyperammoniémie dans la pathogenèse de l'œdème chez les rats BDL.

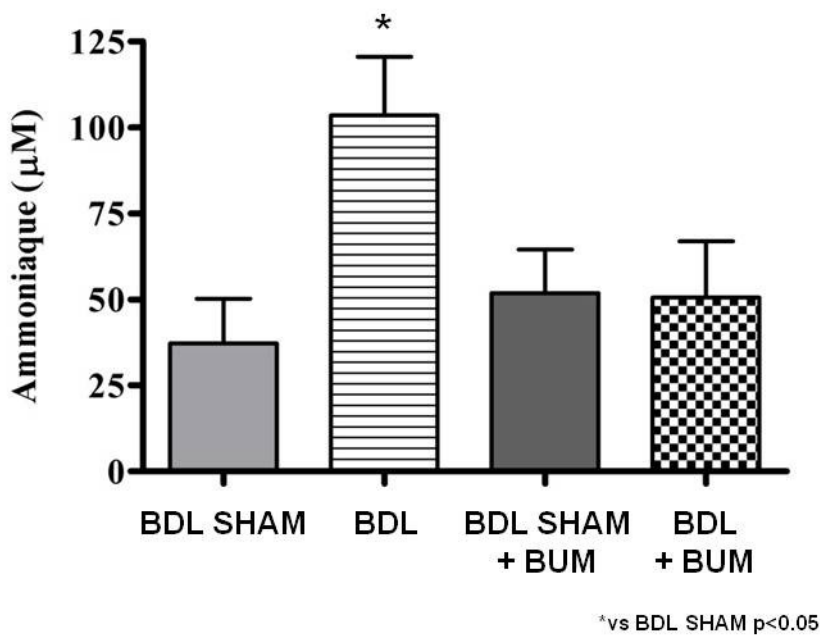


Figure 35. Les concentrations d'ammoniaque (NH_4^+) dans le plasma artériel chez les rats BDL et les rats BDL traités avec de la BUM

Il y a eu une augmentation significative de la concentration d'ammoniaque (NH_4^+) dans le plasma artériel des rats BDL ($n = 5$) comparé aux rats BDL SHAM ($n = 5$). Cette augmentation de la concentration n'a plus été significative chez les rats BDL SHAM ($n = 5$) et les rats BDL ($n = 5$) qui ont été traités avec la BUM. Il n'y avait pas de différence significative entre les rats BDL et BDL + BUM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

4. Le stress oxydatif chez les rats BDL

Le niveau des radicaux libres oxygénés dans le plasma après un traitement avec de la BUM

Chez les rats BDL, il y a présence d'œdème cérébral, d'hyperammoniémie et de stress oxydatif plasmatique. L'AST-120 atténue l'œdème cérébral et l'hyperammoniémie (Bosoi, 2011a) et a pu atténuer la surexpression génique du NKCC1 dans cette présente étude (**Figure 31**). Le traitement avec la BUM chez les rats BDL a dénoté les mêmes effets sur l'œdème (**Figure 27**), l'expression génique du NKCC1 (**Figure 32**) et l'hyperammoniémie (**Figure 35**). L'étude a alors été dirigée vers la présence de stress oxydatif systémique chez les rats BDL, qu'un traitement avec l'AST-120 ne peut éliminer (Bosoi, 2011a) et qui n'est pas observable chez les rats PCA. Ainsi, pour déterminer si le stress oxydatif joue un rôle dans le développement de l'œdème cérébral chez les rats BDL et si le traitement avec la BUM a le même effet que l'AST-120 sur le stress oxydatif, les niveaux de ROS chez les rats BDL traités avec la BUM ont été évalués.

Il a été trouvé que le niveau de radicaux libres dans le plasma des rats BDL ayant subi le traitement de BUM reste élevé, tout comme chez les rats BDL non-traités comparé aux rats BDL SHAM non traités (**Figure 18 C**). En effet, la **Figure 36** montre un niveau de radicaux libres plus élevé chez les rats BDL + BUM (6.89 UFR \pm 1.66) que chez les rats BDL SHAM + BUM (0 UFR).

Alors, la BUM diminue le $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ dans le plasma et l'œdème cérébral mais ne diminue pas le stress oxydatif présent dans le plasma artériel. Ceci est similaire à l'AST-120 qui n'a pu atténuer le stress oxydatif (Bosoi, 2011a). Donc, le stress oxydatif sans hyperammoniémie n'est pas associé à l'œdème cérébral puisque le haut niveau de ROS reste présent même après la résolution de l'œdème cérébral.

A) Radicaux libres oxygénés plasma

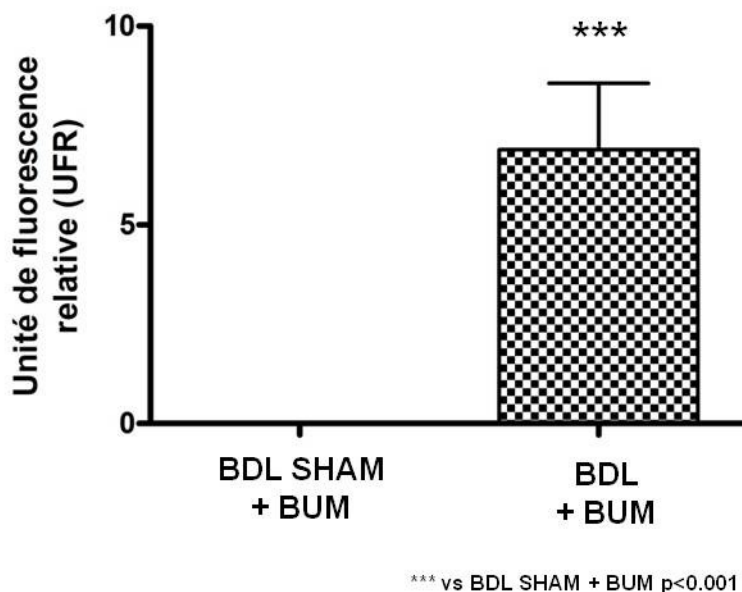


Figure 36. Le niveau des radicaux libres oxygénés dans le plasma artériel chez les rats BDL traités avec la bumétanide

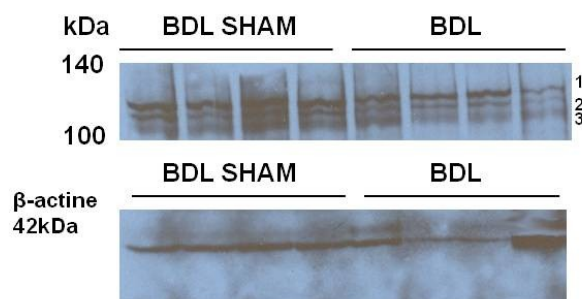
Une augmentation significative de ROS a été trouvée chez les rats BDL ($n = 6$) comparé aux rats BDL SHAM ($n = 6$). Ces deux groupes ont été traités avec des injections de BUM. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Carbonylation des protéines

Un marqueur de stress oxydatif a été étudié afin de confirmer que le stress oxydatif n'est pas impliqué dans la pathogenèse de l'œdème cérébral. La carbonylation est une modification oxydative irréversible de protéines qui est induite par les radicaux libres (Suzuki et al., 2010). Une augmentation du niveau de carbonylation des protéines indiquerait un déséquilibre causé par les ROS. Puisque la présence du stress oxydatif n'a pas été constatée dans le LCR et les tissus cérébraux (Bosoi, 2011b), les cellules endothéliales de la BHE forment un mur maintenant les ROS hors du SNC, mais qui est toutefois susceptible d'être abîmé par les ROS. L'ajout d'un groupe carbonyle (C=O) à leurs protéines serait une indication que le stress oxydatif affecte les protéines de la BHE chez les rats BDL et jouerait un rôle dans la pathogenèse de l'EH minimale.

Le niveau de carbonylation des chaînes latérales des protéines dans les CMV des rats BDL a été estimé par immunobuvardage après une dérivation avec du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH). À la **Figure 37**, chez les rats BDL SHAM et les rats BDL, un niveau similaire de groupes carbonyles a été observé. L'expression relative par rapport à la β -actine de la bande de taille d'environ 140 kDa a été de 1.09 ± 0.12 pour les rats BDL SHAM et de 0.95 ± 0.33 pour les rats BDL. Pour la deuxième bande de taille entre 140 kDa et 100 kDa, elle a été de 0.59 ± 0.01 pour les rats BDL SHAM et de 0.50 ± 0.20 pour les rats BDL. Enfin, pour la bande près de 100 kDa, elle a été de 0.67 ± 0.08 pour les rats BDL SHAM et de 0.76 ± 0.21 pour les rats BDL. Pour les trois protéines, aucune de ces variations n'a été significative. Ces bandes ont été celles qui étaient les plus clairement apparentes sur le gel. En résumé, la carbonylation des protéines dans les CMV ne diffère pas chez les rats BDL malgré la présence de ROS dans le plasma. L'absence de carbonylation supporte l'hypothèse que les ROS sanguins n'affectent pas les CMV de la BHE.

A) Carbonylation des protéines dans les microvaisseaux sanguins cérébraux



B) Quantification

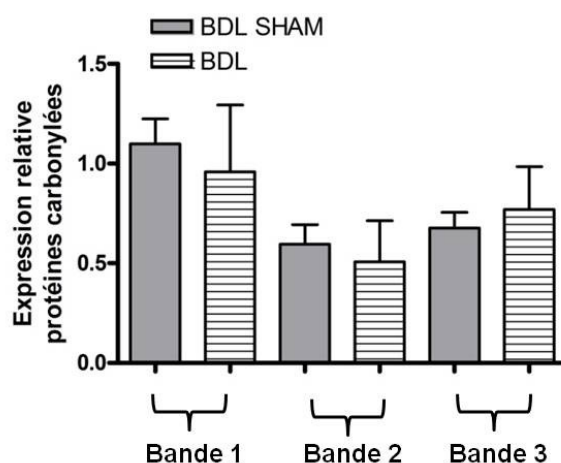


Figure 37 La carbonylation de chaînes latérales des protéines des microvaisseaux sanguins cérébraux chez les rats BDL

La détermination du niveau de carbonylation des chaînes latérales des protéines dans les CMV des rats BDL SHAM ($n = 4$) et BDL ($n = 4$) a été accomplie par la détection des dérivés de DNP par immunobuvardage. Aucune différence significative n'a été observée dans les groupes carbonylés. Trois bandes ont été quantifiées : la protéine la plus près de 140 kDa, la protéine suivante (entre 140 kDa et 100 kDa) et la protéine la plus près de 100 kDa. Leur expression relative a été calculée en normalisant la densité des bandes des dérivés carbonyles avec celle des bandes de β -actine correspondantes. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm S.E.M.

Étant donné que l'implication du NKCC1 et de l'hyperammoniémie chronique seule n'a pas pu expliquer l'œdème cérébral, nous avons dû nous tourner vers d'autres mécanismes possibles. Le stress oxydatif a été choisi parce qu'il est élevé dans le plasma des rats BDL (Bosoi, 2011b). Le stress oxydatif systémique est resté présent,

même en absence d'œdème cérébral réduit par une thérapie de BUM (**Figure 36**) ou d'AST-120 (Bosoi, 2011a). Cela indique que le stress oxydatif sans hyperammoniémie n'est pas un facteur impliqué dans la pathogenèse de l'œdème cérébral. L'absence de carbonylation des protéines des CMV appuie cette conclusion. Cela répond à notre quatrième objectif : l'hyperammoniémie et le stress oxydatif indépendants ne jouent pas un rôle dans la pathogenèse de l'œdème cérébral.

Discussion

La **Figure 38** résume les résultats de ce projet. Chez les rats BDL, l'œdème cérébral est associé avec; i) l'absence d'extravasation de macromolécules de différentes tailles dans le cortex; ii) aucun changement dans l'expression des protéines des JS et iii) aucune activation des MMP-2 et -9 dans le cortex préfrontal. Nous pouvons en conclure que l'œdème cérébral chez les BDL n'est pas d'origine vasogénique mais de type cytotoxique. Les mêmes résultats ont aussi été observés chez les rats PCA, qui ne présentent pas d'œdème cérébral. Comme les niveaux d'hyperammoniémie sont similaires chez les rats BDL et les rats PCA, cela suggère qu'une augmentation de l'ammoniaque (150-250 μM) ne cause pas d'insulte à l'intégrité de la BHE et ne cause pas l'œdème cérébral indépendamment.

La traitement avec de la bumétanide (BUM) a produit une multitude d'effets aux rats BDL : i) une diminution de l'œdème cérébral; ii) une atténuation de l'augmentation d'expression génique du co-transporteur Na-K-Cl (NKCC1) dans les microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV); iii) une atténuation de l'hyperammoniémie; iv) mais aucun changement du stress oxydatif sanguin. La BUM induit les mêmes effets que l'AST-120 (adsorbant du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ sur l'œdème, l'hyperammoniémie, le stress oxydatif (Bosoi, 2011a) et l'ARNm codant pour le NKCC1 dans les microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV). Il a été conclu que cette augmentation d'ARNm est associée à l'œdème mais n'est pas liée à l'hyperammoniémie chronique seule puisque cela n'a pas été trouvé chez les rats PCA. L'élévation de la transcription génique n'a pas été associable à une augmentation d'expression protéique ou de phosphorylation du NKCC1 dans les CMV en relation avec le développement de l'œdème cytotoxique chez les rats BDL. Néanmoins, la BUM et l'AST-120 diminuent l'hyperammoniémie et l'œdème cérébral. Cela suggère qu'un facteur additionnel au $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ favorise le développement de l'œdème chez les rats BDL. Les résultats de cette étude suggèrent que le stress oxydatif seul n'induit pas l'œdème car les niveaux de radicaux libres oxygénés (ROS) dans le

sang des BDL ne varient pas lorsque l'œdème cérébral et l'hyperammoniémie sont atténués par la BUM et l'AST-120. L'absence de variation de la carbonylation des protéines des CMV malgré la présence du stress oxydatif dans le plasma appuie cette dernière conclusion. Toutefois, le stress oxydatif est présent avec l'hyperammoniémie dans le développement de l'œdème cérébral. Cela suggère qu'il y a un effet synergique entre le stress oxydatif et l'hyperammoniémie dans la pathogenèse de l'œdème cérébral dans la cirrhose du foie.

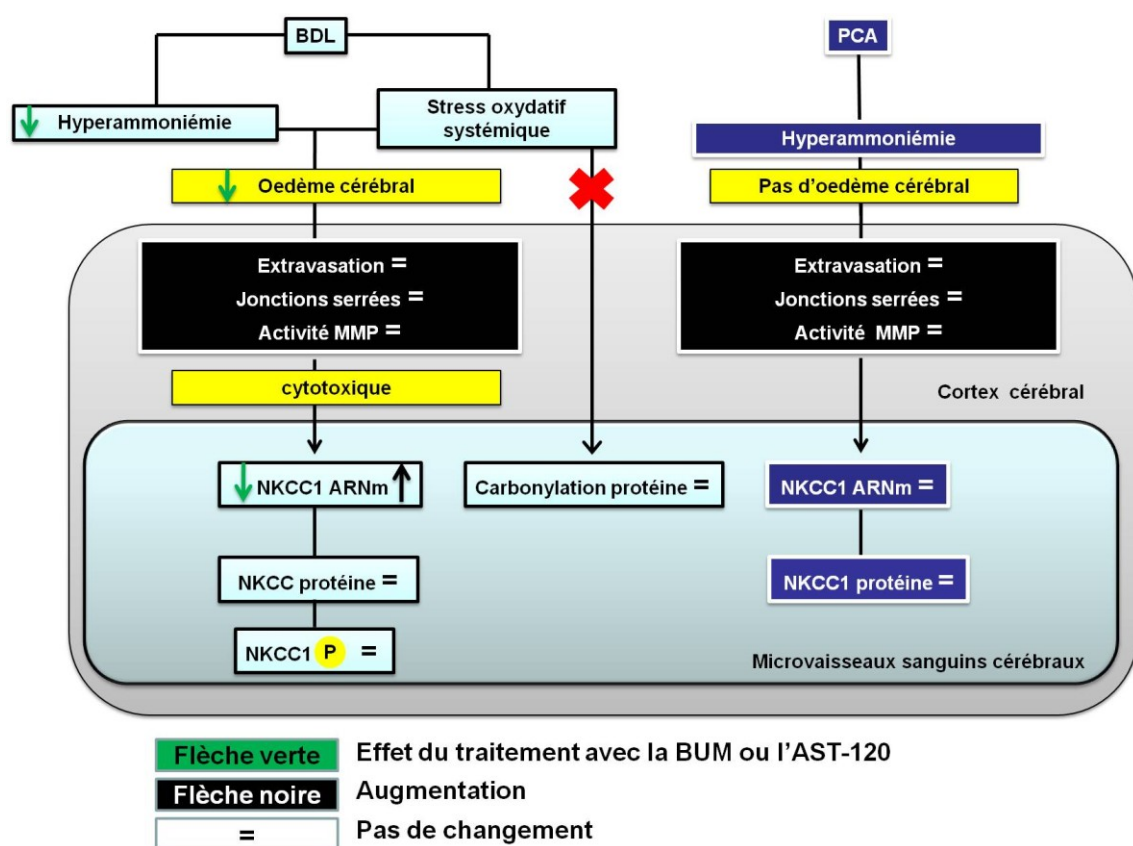


Figure 38. Résumé des résultats du projet

L'œdème cérébral chez les rats BDL n'est pas d'origine vasogénique mais plutôt d'origine cytotoxique. Le NKCC1 et le stress oxydatif comme facteur indépendant ne sont pas impliqués dans la pathogenèse de l'œdème cytotoxique chez les rats BDL. Le bleu pâle des cases correspond aux observations obtenues chez les rats BDL. Le bleu foncé représente les rats PCA.

1. Origine de l'œdème cérébral chez les rats BDL

L'œdème chez les patients cirrhotiques

L'origine de la pathogenèse de l'œdème cérébral lors d'une insuffisance hépatique chronique n'a pas encore été définie chez les patients. Auparavant, la technologie ne permettait pas de détecter les changements subtils d'eau dans le cerveau. De nos jours, l'imagerie par résonance magnétique offre une meilleure compréhension de la pathogenèse de l'œdème (Córdoba, 2001; Lodi, 2004; Kale et al., 2006; Poveda, 2010; Rovira, 2001). Cette technique d'imagerie utilise le transfert de magnétisation (*magnetization transfer imaging*), basée sur le transfert des protons de l'eau avec ceux des macromolécules dans le cerveau et cela est quantifié par le ratio de transfert de magnétisation (*magnetization transfer ratio*). Une augmentation d'eau dans le cerveau cause une diminution de ce ratio. Grâce à cette technique, des études ont démontré qu'il y avait une augmentation d'eau dans le cerveau des patients cirrhotiques mais la technique ne peut pas localiser la distribution de l'eau précisément dans le cerveau (intracellulaire vs extracellulaire) (Córdoba, 2001; Rovira, 2001; Rovira et al., 2007; Rovira et al., 2008). De plus, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) n'a pas été étudiée et l'origine de la pathogenèse de l'œdème cérébral ne peut être adéquatement définie. Une technique alternative pour l'étude de la perméabilité de la BHE chez les patients est la tomographie par émission de positron. Toutefois, la résolution spatiale et l'information sont limitées quant aux parties anatomiques représentées par les résultats de la tomographie par émission de positron (Weissenborn et al., 2004).

L'intégrité de la BHE dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale

Dans les modèles expérimentaux de cirrhose du foie, quelques études sur l'origine de l'œdème cérébral ont été faites. L'œdème chez le modèle BDL est recensé dans la littérature récente (Bosoi, 2011a; Davies, 2009; Wright, 2007b; Wright et al., 2010). Seule l'étude de Wright et collaborateurs (2007) propose que l'œdème soit d'origine cytotoxique lors de l'induction d'inflammation. Une injection de lypopolysaccharides (LPS) a provoqué une réaction inflammatoire et une augmentation d'eau cérébrale chez les rats BDL de quatre semaines. Ensuite, le nitrate de lanthanum, a été injecté chez ces rats BDL pour tester la BHE. Aucune extravasation de cette molécule n'a été observée par microscopie électronique malgré une augmentation d'eau dans le SNC qui cause l'affaissement de CMV. Les différences majeures entre notre étude et celle de Wright et collaborateurs (2007) sont que les rats BDL n'ont pas d'œdème à 4 semaines et que le LPS injecté à la 4^{ème} semaine provoque l'œdème. Lorsqu'injecté, le LPS a augmenté le niveau de cytokines dans le cerveau et le plasma des rats BDL et BDL SHAM. Ces rats BDL ont montré des signes de perte de conscience indiquant qu'ils étaient dans un stade de pré-coma et développent l'œdème cérébral. Cela n'est pas observé dans notre modèle BDL à 4 semaines sans LPS. Il est à noter dans l'étude de Wright et collaborateurs (2007) que les rats SHAM ont aussi développé l'œdème cérébral après avoir reçu du LPS, sans perte de conscience. Cela nous suggère que l'inflammation pourrait avoir un rôle dans l'œdème cytotoxique chez les rats BDL qui sont dans le coma.

Nos données démontrent une absence d'extravasation de macromolécule d'Evans Blue (EB) et de fluorescéine de sodium (NaF) dans le modèle BDL. Ceci a été déterminé dans les deux hémisphères cérébraux en entier afin de recueillir le maximum de tissus cérébraux possible. L'EB est une molécule qui se lie avec une grande affinité à l'albumine dont le poids est de 67 kDa (Krizbai, 2005). Une extravasation d'EB signifie que la BHE serait perméable aux protéines et révélerait des dommages importants à la BHE. La NaF est une molécule de 376 Da et son extravasation indiquerait plutôt des

dommages permettant la diffusion paracellulaire de plus petites molécules comme les ions. En plus, l'absence totale de NaF suggère qu'il n'y ait pas de rupture subtile des jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui permettraient au NaF de s'infiltrer. Chez les rats où l'EB et le NaF ont été injectés, le corps a été perfusé avec de la saline avant de récupérer les cerveaux pour l'analyse d'extravasation. Cela a permis d'enlever le sang contenant de l'EB et du NaF afin de ne détecter que les molécules qui ont pu pénétrer dans le SNC. Tant chez les BDL, et les PCA que chez leur SHAM contrôle respectifs, le cerveau n'était pas coloré à vue d'œil (résultats non-montrés). L'absence de site d'extravasation dans le cerveau a indiqué que la BHE était intacte et l'administration d'une dose toxique de mannitol (contrôle positif) prouve la validité du protocole. Ainsi, notre étude a clairement défini que l'œdème chez les rats BDL de six semaines est d'origine cytotoxique. Le modèle BDL de 4 semaines dans l'étude de Wright et collaborateurs (2007) nous suggère aussi que le temps d'exposition à l'hyperammoniémie et au stress oxydatif chez les rats BDL joue un rôle important dans l'œdème cérébral.

La technique d'extravasation d'EB offre une possibilité d'étudier la perméabilité de la BHE aux protéines. Ceci est plus difficile chez les patients cirrhotiques parce que des techniques invasives ne peuvent pas être facilement utilisées en imagerie par résonance magnétique et en tomographie en émission de positron. Il y a quelques alternatives à cette technique. Premièrement, d'autres molécules auraient pu être utilisées comme le bleu de trypan, le nitrate de lanthanum, des anticorps IgG ou la peroxydase de rainfort (HRP). L'EB et NaF ont été choisis parce qu'ils sont abondamment utilisés dans de nombreuses études. L'injection par l'artère carotide aurait été une possibilité pour injecter une solution plus concentrée d'EB et de NaF. En effet, l'EB et le NaF peuvent colorer d'autres organes du corps comme le foie, les yeux et les reins avant d'atteindre le cerveau. Néanmoins, l'injection i.v. est plus facile et les concentrations ont été choisies selon la littérature. Une meilleure alternative est de visualiser l'extravasation de l'EB par microscopie confocale (del Valle et al., 2008). Cela permettrait d'observer des régions précises d'extravasation hors des capillaires.

L'intégrité des jonctions serrées dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale

Les protéines membranaires intégrales des jonctions serrées (JS) scellent l'espace paracellulaire et empêchent la diffusion paracellulaire de macromolécules. Les CMV présentent une plus grande quantité de JS que les cellules endothéliales du reste de l'organisme (Hawkins, 2005). La claudine-5 et l'occludine sont les protéines transmembranaires qui scellent l'espace paracellulaire. La claudine-5 a été choisie parmi les autres isoformes parce qu'elle est exprimé par les CMV (Nitta, 2003). Une réduction de l'expression d'occludine et de claudine-5 a été associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE à l'EB dans un modèle d'ischémie cérébrale (Ishrat, 2010). Les ZO sont des protéines cytoplasmiques qui servent de protéines d'échafaudage qui lient les protéines des JS au cytosquelette d'actine de la cellule. Elles contrôlent la distribution spatiale des JS et elles sont indispensables à leur stabilité (Hawkins, 2005). Il y a une augmentation de la perméabilité de la BHE à l'EB dans le cortex cérébral. Cette augmentation de la perméabilité a été associée à une diminution de l'expression génique et protéique de ZO-1 (Jiao et al., 2011). Chez des souris en stade pré-coma dû à une insuffisance hépatique aiguë, l'expression de ZO-2 est diminuée et corrèle avec une augmentation de la perméabilité de la BHE au NaF (Shimajima, 2008). Dans cette présente étude, aucune variation dans l'expression protéique des protéines des JS (claudine-5, occludine, ZO-1 et ZO-2) a été observée dans le cortex préfrontal chez les rats BDL de six semaines et les rats PCA de quatre semaines. Cela suggère fortement que les protéines intégrales de la membrane des JS sont intactes et scellent normalement l'espace paracellulaire et que les protéines cytoplasmiques stabilisent normalement les JS dans les deux modèles. Ceci est un autre indice que l'œdème n'est pas d'origine vasogénique et ce résultat peut donc être associé à l'absence de détection d'extravasation chez les rats BDL et les rats PCA. De plus, nos expériences ont ciblé une région plus précise du cerveau (cortex préfrontal) contrairement à l'étude de la perméabilité de la BHE par extravasation ciblant les hémisphères cérébraux. Puisqu'il y a une déficience subtile des fonctions cognitives dans l'EH minimale, cette région a été choisie parce qu'elle est le siège de différentes fonctions cognitives supérieures. Il n'a

pas été nécessaire d'isoler les CMV car les JS ne sont présentes que sur les CMV, permettant d'utiliser des lysats de cortex préfrontaux. En contrepartie, une diminution de l'expression d'occludine dans les CMV du cortex a été déterminée à 1, 5 et 10 jours chez les rats BDL sans présence d'œdème cérébral (Faropoulos, 2010). Cette altération n'a pas été observée dans notre modèle BDL de 6 semaines. Cela suggère qu'il y a un mécanisme compensatoire à long terme ou que l'effet soit réversible. Le modèle d'hypertension portale pré-hépatique nous donne quelques pistes. Ce modèle de rat consiste en une sténose de la veine porte, augmentant la pression dans celle-ci. L'hypertension portale est aussi une caractéristique de la cirrhose du foie. Une diminution de ZO-2 a été observée chez ce modèle de rat à 14 jours après l'opération chirurgicale. Cependant, au 40^{ème} jour, la pression a descendu dans la veine porte, la variation dans l'expression de ZO-2 n'est plus significative (Eizayaga et al., 2006). Les auteurs croient qu'il y a des collatérales qui se forment tardivement dans le modèle afin de réduire la pression. Ceci est un bon exemple de réversibilité. Étant donné que la cirrhose du foie mène à l'hypertension (Steib et al., 2010a; Steib et al., 2010b), ce mécanisme est plausible dans le modèle BDL pour expliquer la diminution d'expression d'occludine à 10 jours (Faropoulos, 2010).

L'immunobuvardage a été la technique choisie pour analyser les protéines parce qu'elle est facile à effectuer et à reproduire. Cependant, de grandes variabilités sont retrouvées dans les résultats. Un plus grand groupe d'animaux aurait pu régler cette situation. Malheureusement, la disponibilité des échantillons était limitée. Ainsi, la quantité d'échantillon a été augmentée seulement pour l'étude de claudin-5. Pour les JS, l'immunofluorescence aurait été une alternative possible. En effet, dans des conditions physiologiques normales, au microscope, la protéine occludine apparaît dans un patron continu et organisé tandis que dans des conditions pathologiques, une disruption du patron est observable. Par exemple, chez les souris déficientes en thiamine, une délocalisation des occludines est notable par microscope (Beauchesne et al., 2009).

Les métalloprotéinases matricielles dans l'œdème cérébral lors d'une cirrhose du foie expérimentale

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont les principales protéinases pouvant dégrader la matrice extracellulaire et les JS. Elles jouent un rôle fondamental dans la réparation des tissus, la signalisation, l'apoptose et la croissance cellulaire. Les deux principales MMP étudiées sont la MMP-9, exprimée par les cellules endothéliales de la BHE, et la MMP-2, exprimée par les astrocytes (Candelario-Jalil, 2009). Les MMP sont impliquées dans la rupture de la BHE dans l'ischémie (Gasche, 1999; Ishrat, 2010), le trauma crânien (Shigemori, 2006) et la neuroinflammation (Candelario-Jalil et al., 2007). L'hypothèse principale est que des facteurs relâchés par le cerveau activent les MMP qui dégradent la matrice extracellulaire et causent ainsi une rupture de la BHE. Ces facteurs incluent les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Candelario-Jalil, 2007), les interleukines (IL-1) (Lim et al., 2011) et le stress oxydatif (Gasche, 2001). Dans notre modèle BDL, l'activité de MMP-9 et de MMP-2 n'a pas été observée dans le cortex préfrontal. L'œdème cérébral chez les rats BDL n'active pas les MMP et vice versa. Cela concorde avec une absence d'extravasation et une stabilité de l'expression des protéines des JS malgré la perturbation osmotique chez les rats BDL. Alors, le stress oxydatif dans le sang, l'hyperammoniémie, les facteurs impliqués dans la cirrhose du foie et l'augmentation d'eau cérébrale chez les BDL ne sont pas associés à des MMP actives dans le cortex préfrontal. Dans une étude, les auteurs proposent que le MMP-9 provienne du foie endommagé et atteignent les capillaires de la BHE pour dégrader la matrice extracellulaire et ainsi augmenter la perméabilité de la BHE à l'EB (Nguyen, 2006). Ceci est très plausible car une augmentation de MMP-9 dans le sérum des patients cirrhotiques corrèle avec les niveaux d'AST et d'ALT, des marqueurs de dommage hépatique, dans le plasma (Helaly, 2011). Ce mécanisme est intéressant et différent de celui des modèles d'ischémie où l'activation des MMP-9 viendrait du SNC. Par contre, dans notre étude, l'expression des MMP dans le sang n'a pas été déterminée, étant donné l'absence de leur activité dans le cortex chez les BDL et que la perméabilité de la BHE à l'EB et au NaF n'a pas été détectée. Alors, nous croyons qu'il n'y ait pas d'activation de MMP lors de la cirrhose du foie dans les BDL puisque les expériences

d'extravasation nous ont appris que la BHE n'est pas endommagée. En bref, selon les résultats des trois expériences (extravasation, JS et MMP), l'œdème cérébral chez les rats BDL n'est pas d'origine vasogénique mais plutôt d'origine cytotoxique.

La technique utilisée (zymographie) dans cette étude est simple, sensible et fréquemment utilisée dans la littérature. Présentement, c'est la technique la plus pratique pour analyser l'activité des MMP (Kupai et al., 2010). L'électrophorèse permet de séparer les MMP des *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* (TIMP, inhibiteurs de MMP). La digestion de la gélatine produit des bandes quantifiables dans le gel de polyacrylamide. Une alternative à ce protocole serait la zymographie *in situ*. Cela consiste à ajouter directement les substrats enzymatiques au tissu cérébral. La localisation de l'activité des MMP est précise par microscope. Toutefois, la sensibilité est faible et la quantification de l'activité est difficile (Kupai, 2010).

Effets de l'hyperammoniémie chronique chez les PCA sur la BHE

Les mêmes expériences ont été exécutées en parallèle chez les rats PCA où le facteur pathogénique est une hyperammoniémie chronique (150-250 μM) dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (**Figure 18 A**). Des concentrations similaires sont observables chez les rats BDL. Cela a permis d'étudier l'effet de l'hyperammoniémie chronique sur la BHE. D'abord, l'hyperammoniémie chronique seule n'induit pas l'œdème cérébral chez les rats PCA (**Figure 20 B**). Dans la présente étude, par les techniques de spectrophotométrie et de fluorométrie, nous n'avons pas détecté d'extravasation d'EB et de NaF dans le cortex après 4 semaines d'hyperammoniémie chronique. Alors, l'hyperammoniémie chronique n'affecte pas la perméabilité de la BHE dans le cortex cérébral et n'induit pas l'œdème cérébral. Pour confirmer la conclusion que l'hyperammoniémie chronique ne change pas la perméabilité de la BHE en relation avec l'œdème cérébral, l'expression des protéines des JS a été étudiée. Nos résultats révèlent que l'hyperammoniémie chronique ne peut pas causer une augmentation de la perméabilité de la BHE aux macromolécules (**Figure 21 B**) et ne modifie pas l'intégrité des JS. Ce résultat avait été prévu puisqu'il y avait absence

d'extravasation des colorants EB et NaF chez les rats PCA. Les résultats de zymographie supportent aussi la conclusion de l'intégrité intacte de la BHE des rats PCA. Cependant, l'hyperammoniémie chronique indépendante n'active pas les MMP dans le cortex préfrontal.

Ces trois expériences soutiennent que l'hyperammoniémie chronique indépendamment de d'autres facteurs n'affecte pas la BHE. Ils nous indiquent que l'hypothèse du métabolisme du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ et de ses effets toxiques lors d'une hyperammoniémie chronique n'est pas suffisante pour expliquer l'œdème cérébral dans les rats BDL, étant donné que l'hyperammoniémie chez les rats PCA ne cause pas l'œdème et n'affecte pas la BHE.

Rôle de l'œdème dans l'EH

Insuffisance hépatique aiguë

De hautes concentrations du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (1-5 mM) induisent le gonflement des astrocytes *in vitro* (Jayakumar et al., 2009; Jayakumar, 2010; Norenberg, 2005). Chez les rats PCA, l'œdème est induit lorsqu'une quantité du NH_3 supplémentaire leur est administrée (Córdoba, 1999; Chung et al., 2001; Blei, 1994; Master et al., 1999). Par exemple, une infusion du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (55 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$) dans la veine fémorale cause le développement de l'œdème chez les rats PCA après une semaine. Chez ces rats, l'hyperammoniémie a atteint 950 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (Chung, 2001). Dans une autre recherche chez des rats normaux, de fortes doses non-létales du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (750 et 600 mg/kg d'acétate d'ammonium) ont été injectées par voie i.p, l'extravasation d'EB a été retrouvée dans le thalamus et le cervelet (Ziylan et al., 1993). Ces doses ont provoqué chez les rats un coma profond. Alors, dans les modèles d'insuffisance hépatique aiguë, l'hyperammoniémie mène à un coma où l'on retrouve l'œdème cérébral. L'origine de cet œdème associé avec le coma n'est pas bien définie. Certaines études expérimentales suggèrent que l'origine de l'œdème cérébral est vasogénique parce que la détection d'extravasation est notable dans leur modèle (Chen, 2009; Nguyen, 2006; Shimojima, 2008; Yamamoto, 2006) tandis que d'autres études proposent un mécanisme

cytotoxique (Chavarria, 2010; Traber et al., 1987). Dans l'hypothèse de l'origine cytotoxique, le NH_3 engendre un déséquilibre de l'homéostasie des acides aminés (Swain et al., 1992). Une explication de ce mécanisme repose sur la glutamine synthétase présente dans les astrocytes. Cette enzyme, présente seulement dans les astrocytes, convertit le NH_3 et le glutamate en glutamine (Tansey, 1991) (**Figure 7**). L'hyperammoniémie causée par une insuffisance hépatique saturerait cette enzyme et causerait une accumulation de glutamine qui serait responsable de l'accumulation d'eau dans les astrocytes parce que cet acide aminé est un puissant osmolyte (Norenberg, 2005). Alors, selon ces études, l'hyperammoniémie sévère et aiguë peut induire un œdème cérébral associé à des symptômes de coma tandis que nos résultats démontrent que l'hyperammoniémie chronique (150-250 μM) n'induit pas l'œdème.

Insuffisance hépatique chronique

À notre connaissance, il n'y a pas d'étude sur l'origine de la pathogenèse de l'œdème cérébral dans les modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique chronique (PCA, BDL). Nos expériences sur la BHE chez les rats BDL âgés de 6 semaines ont permis de prouver que son origine est cytotoxique. Lors de l'insuffisance hépatique chronique, l'œdème n'est pas associé à des symptômes de pré-coma ou de coma contrairement à l'insuffisance hépatique aiguë. Les conséquences de cette hydratation cytotoxique du cerveau sont nébuleuses. Il est proposé que l'hydratation anormale des cellules du SNC (astrocytes) ait de nombreux effets comme l'activation de voies de signalisation, l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire et la régulation de l'ARNm codant pour des transporteurs d'acides aminés et d'ions (Häussinger, 2000). L'augmentation du volume cellulaire des astrocytes peut mener à la dysfonction des neurones puisque les astrocytes jouent un rôle important dans plusieurs fonctions du SNC. Cette hypothèse peut expliquer les déficiences cognitives subtiles chez les patients cirrhotiques. Enfin, l'augmentation d'eau dans le SNC peut perturber la diffusion des molécules, des ions et des neurotransmetteurs (Häussinger et al., 2008).

2. Le NKCC1 et l'œdème chez les rats

BDL

La bumétanide (inhibiteur du NKCC)

L'étude du co-transporteur du Na-K-Cl 1 (NKCC1) dans l'œdème cytotoxique est justifiée puisque celui-ci est un régulateur du volume cellulaire notamment dans les érythrocytes, les neurones, les astrocytes et les cellules épithéliales (Kahle, 2010). La bumétanide (BUM) inhibe le co-transporteur du Na-K-Cl (NKCC). Sa spécificité au NKCC1 est très élevée même à faible dose (Hannaert et al., 2002) et elle se lie à un des sites de liaison du Cl⁻ (Haas, 1983). Des auteurs croient que les sites de liaison du Cl⁻ se situent aux domaines transmembranaires 2, 4 et 7 (Isenring et al., 1998a). Chez les rats, la BUM peut être convertie en métabolite inactif par le foie ou être simplement excrétée par les reins (Lee et al., 1994). La dose utilisée dans notre étude est de 10 mg/kg et a été choisie parce que cette dose a réduit l'œdème cérébral des rats ayant reçu des injections de la BUM et de thioacétamide, une hépatotoxine provoquant une insuffisance hépatique aiguë, comparé aux rats qui ont seulement reçu la thioacétamide (Jayakumar, 2011). Dans d'autres modèles, diabète et trauma crânien, l'efficacité de la BUM à réduire l'œdème cérébral a été prouvée par une injection de BUM (Lam et al., 2005; Lu et al., 2006). Dans notre étude, le traitement avec la BUM a pu réduire l'œdème cérébral chez les rats BDL. Cela suggère que le NKCC1 dans les CMV contribue au développement de l'œdème cérébral.

Doses et nature du traitement de la bumétanide

À l'aide de microscopie électronique, O'Donnell et al. (2004a) ont conclu qu'une proportion de 80% des NKCC1 se trouvait du côté luminal des CMV. Alors, les auteurs ont ciblé les NKCC1 dans les CMV. Ils ont injecté la BUM par voie intraveineuse chez les rats néphrectomisés, 20 min avant de subir une occlusion d'une durée de 2 h de l'artère carotide. Les rats qui n'ont pas reçu l'injection de la BUM avant

l'ischémie cérébrale avaient un pourcentage d'eau plus élevé dans le cerveau par analyse gravimétrique et par imagerie de résonance magnétique que les rats traités. De plus, une étude pharmacologique a démontré que la BUM ne traverse pas la BHE facilement (Chen, 1996). Alors, il est juste de dire que la BUM administrée par voie i.v. inhibe le NKCC1 sur les CMV. Alors, dans cette présente étude, la BUM a été administrée par voie intrapéritonéale. La BUM est alors absorbée dans les intestins vers la circulation sanguine et peut atteindre le cerveau pour inhiber le NKCC1 sur les CMV. Le traitement avec de la BUM a été commencé au 32^{ème} jour (pour 10 jours) après la ligature de la voie biliaire, avant l'apparition de l'œdème cérébral. En effet, l'œdème cérébral chez les rats BDL apparaît 4 semaines la ligature de la voie biliaire (résultats non-montrés). Dans une autre étude, la BUM a été administrée par microdialyse après l'apparition de l'œdème lors d'une ischémie cérébrale (Yan, 2003). L'œdème cérébral n'a pas été atténué contrairement à celui des rats où la BUM a été administrée avant l'occlusion de la carotide et donc avant le développement de l'œdème (Yan, 2003). Cela suggère que le NKCC1 joue un rôle tôt dans le développement de l'œdème cérébral dans l'ischémie cérébrale. Alors, un traitement préventif de BUM a été choisi et administré avant l'apparition de l'œdème chez les rats BDL. La BUM a pu prévenir l'augmentation d'eau dans le cortex (**Figure 27**).

D'un autre côté, des auteurs suggèrent que la BUM puisse traverser la BHE et inhiber le NKCC1 sur les astrocytes et les neurones (Jayakumar, 2011). Un traitement i.p. de la BUM similaire à celui de cette présente étude a été utilisé dans un modèle d'insuffisance hépatique aiguë et a atténué l'œdème. Ils soutiennent que 33% de la BUM injectée puisse passer la BHE (Javaheri et al., 1993). Cela pourrait être dû à un dommage aux CMV de la BHE permettant le passage du diurétique. L'étude de la perméabilité n'a pas été effectuée dans ce modèle d'insuffisance hépatique aiguë (Jayakumar, 2011). En effet, d'autres chercheurs ont trouvé une augmentation de la perméabilité de la BHE à l'EB avec un œdème vasogénique dans d'autres modèles d'insuffisance hépatique aiguë (Chen, 2009; Nguyen, 2006; Shimojima, 2008; Yamamoto, 2006). Selon les expériences de ce projet, la BHE dans le modèle BDL est

intacte et suggèrent que la BUM ne passe pas paracellulairement à cause de dommages aux CMV. Néanmoins, il y a une évidence que la BUM puisse traverser la BHE (Javaheri, 1993). Ceci serait un moyen de diminuer l'œdème en inhibant le NKCC1 sur les astrocytes mais cela reste encore à prouver dans notre modèle. Malgré tout, l'étude présente n'a regardé que le NKCC1 sur les CMV plutôt que le NKCC1 sur les astrocytes et les neurones dans un modèle chronique.

Effet de BUM dans les reins

Les reins et le métabolisme du NH_3/NH_4^+

Les reins possèdent deux moyens d'éliminer le NH_3/NH_4^+ . D'abord, ils secrètent l'urée provenant du foie. Ensuite, ils peuvent capturer la glutamine dans le sang et la métaboliser en glutamate et en NH_4^+ pour ensuite excréter l'ion ammonium dans l'urine (Olde Damink et al., 2003). Dans des conditions physiologiques normales, 70% de NH_4^+ produite par les reins est réabsorbée dans le sang et 30% est éliminée dans l'urine (Jalan et al., 2003). Dans l'insuffisance hépatique chronique, les reins deviennent une source importante d'excrétion du NH_4^+ lors de l'hyperammoniémie. Cela a été démontré chez des patients cirrhotiques souffrant de saignements gastro-intestinaux (Olde Damink, 2003).

La BUM et NKCC2

La dose de 10 mg/kg a des effets diurétiques chez les rats normaux malgré leur haut métabolisme de la drogue (Brandt et al., 2010). En effet, la BUM peut aussi inhiber le NKCC2 qui se trouve exclusivement dans les reins (Haas, 1994). Nous avons sondé l'influence de la BUM sur l'élimination du NH_4^+ parce que dans la branche ascendante de l'anse de Henle des reins, le NKCC2 est le médiateur majeur de réabsorption de NH_4^+ (Weiner, 2011). La BUM inhibe le NKCC2 et empêche la réabsorption du NH_4^+ et cela cause subséquemment, l'augmentation du NH_4^+ dans l'urine. Dans les études où la BUM est employée, les rats subissent une néphrectomie afin d'étudier l'effet de l'inhibition du NKCC1 indépendamment de celui du NKCC2 (Lam, 2005; O'Donnell, 2004a; Yan, 2003). Dans la présente étude, les rats BDL ayant reçu la thérapie à la

BUM pour 10 jours n'ont pas subi de néphrectomie parce que nous avons estimé que cela aurait considérablement réduit leur chance de survie et que cela aurait pu provoquer d'autres effets secondaires indésirables. Alors, il est juste de proposer que la BUM a pu améliorer l'excrétion de NH_4^+ dans les reins en inhibant NKCC2 et en conséquence, atténuer l'hyperammoniémie. Effectivement, nos résultats ont confirmé que l'hyperammoniémie a été amoindrie chez les rats BDL traités avec la BUM. Cet effet a été observé en parallèle avec une diminution de l'œdème cérébral. Il se peut alors que le mécanisme d'atténuation de l'œdème implique une inhibition du NKCC1 et aussi un effet diurétique qui augmente l'excrétion d'urine et diminue l'hyperammoniémie par l'inhibition du NKCC2.

3. Expression génique du NKCC1 et l'œdème chez les rats BDL

Transcription génique du NKCC1

À plusieurs reprises, une augmentation du niveau de transcription du NKCC1 a été retrouvée dans l'hippocampe (Lu et al., 2007; Lu, 2008) et le plexus choroïde (Lu, 2006) chez des modèles de trauma crânien où l'œdème cérébral est présent dans le cortex. Lu et al. (2007) ont administré une seule dose de la BUM i.v. 20 min avant le trauma et cela a aidé à réduire l'œdème. Dans notre modèle de cirrhose de foie, il y a une augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 dans les CMV en présence d'œdème cérébral dans le cortex. Malheureusement, les méthodes dans cette étude ne permettent pas de localiser précisément les régions touchées parce que les CMV ont été isolés à partir d'un lysat de l'hémisphère cérébral gauche, du cervelet et du tronc cérébral. Ces deux régions du SNC ont été rajoutées afin d'augmenter la quantité de CMV isolés.

Le modèle PCA démontre que l'hyperammoniémie chronique indépendante (de niveau similaire à celles des rats BDL) ne modifie pas l'expression génique du NKCC1 dans les CMV. Le traitement à la BUM a été administré avant l'apparition de l'œdème cérébral. En concordance avec ces résultats, il se peut que l'augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 survienne avant l'apparition de l'œdème cérébral. En bref, il y a un facteur chez les rats BDL qui augmente la transcription génique du NKCC1 et ce n'est pas l'hyperammoniémie chronique seule.

Effet de l'AST-120 et de la BUM sur l'ARNm du NKCC1

L'AST-120 offre une possibilité d'associer l'augmentation de transcription du NKCC1 à l'œdème cérébral et de mieux comprendre la relation entre la transcription du NKCC1 et l'hyperammoniémie chronique. L'AST-120 est un adsorbant oral composé de microsphères de charbon pouvant adsorber les molécules du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Le traitement avec l'AST-120 diminue l'hyperammoniémie et l'œdème cérébral chez les

rats BDL (Bosoi, 2011a). Le gavage d'AST-120 chez les rats BDL a pu normaliser l'expression d'ARNm codant pour le NKCC1. La BUM a aussi eu le même effet que l'AST-120 sur l'œdème cérébral en diminuant l'expression génique et l'hyperammoniémie. D'abord, lorsque l'œdème n'est pas présent (PCA), l'expression génique est normale tandis que l'augmentation de la transcription est observable en présence d'œdème cérébral (BDL). Lorsque l'œdème est atténué (BDL + BUM et BDL + AST-120), la transcription revient à la normale. Alors, ces résultats associent l'augmentation d'ARNm avec l'œdème cérébral. Ainsi, il est possible que l'augmentation de la transcription génique puisse être une conséquence de l'œdème cérébral. Ensuite, nous savons que l'hyperammoniémie chez les rats PCA ne cause pas l'œdème et n'affecte pas le NKCC1. Toutefois, cette hyperammoniémie chronique est présente chez les rats BDL avec l'augmentation parallèle de l'expression génique du NKCC1. Cela suggère qu'il y ait un facteur indépendant présent lors de l'œdème cérébral chez les rats BDL qui module la transcription du NKCC1 dans les CMV. De plus, l'hyperammoniémie chronique est nécessaire à ce facteur pour induire l'œdème cérébral chez les rats BDL. Néanmoins, l'ARNm du NKCC1 est associé à l'œdème cérébral chez les rats BDL.

Mécanisme de régulation de l'ARNm codant pour le NKCC1 chez les rats BDL

Le mécanisme de régulation de la transcription génique du NKCC1 ne repose pas directement et uniquement sur l'inhibition de la protéine NKCC1 par la BUM au niveau des CMV. Il s'explique aussi par l'effet de diminution de l'hyperammoniémie menant à une atténuation de l'œdème cérébral chez les rats BDL. Des auteurs proposent que le changement de volume cause l'activation de récepteurs qui régulent la transcription dans le cerveau (Häussinger, 2006). Donc, la transcription du NKCC1 pourrait être associée à l'œdème. Dans un modèle de trauma crânien présentant l'œdème cérébral, des auteurs ont trouvé une augmentation d'ARNm codant pour l'aquaporine 4, une protéine membranaire intégrale qui régule le mouvement de l'eau, sans augmentation de son expression protéique (Sun et al., 2003). D'autres augmentations

d'ARNm sont associées à un oedème cérébral comme celle de la COX-2 (Nogawa et al., 1997) et des récepteurs bradykinine (Grogger et al., 2005). Alors, en diminuant l'hyperammoniémie, l'oedème cérébral est atténué en parallèle avec l'atténuation de l'augmentation du niveau d'ARNm codant pour le NKCC1.

Les cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et interleukine-1 β , seraient des actrices possibles dans la régulation de l'ARNm codant pour le NKCC1 puisque celles-ci sont des facteurs précipitants dans la pathogenèse de l'EH (Odeh et al., 2004; Seyan, 2010; Shawcross, 2010). Il a été suggéré que l'interleukine-1 β active la cascade Raf/MEK/MAPK qui, en retour, augmente la transcription génique du NKCC1 (Lu, 2008). En effet, la présence des ces cytokines dans le sang serait reliée à la cirrhose du foie (Odeh, 2004). De plus, l'augmentation d'eau cérébrale pourrait induire le relâchement de cytokines par les astrocytes (Shawcross, 2005). Cependant, les facteurs pro-inflammatoires n'ont pas été mesurés dans cette présente étude. Dans tous les cas, l'hyperammoniémie jouerait un rôle avec ce facteur inconnu dans la pathogenèse de l'oedème cérébral chez les rats BDL. Nous proposons un effet synergique entre ce facteur inconnu et l'hyperammoniémie sur la régulation de la transcription du NKCC1. Ceci est vraisemblable puisque lorsque l'hyperammoniémie est réduite (par la BUM ou l'AST-120), l'oedème est atténué. Ultimement, ce facteur n'est pas présent chez les rats PCA. Bref, la transcription du NKCC1 est associée à l'oedème cérébral et non à l'hyperammoniémie isolée. Des études complémentaires sont alors nécessaires pour trouver le facteur impliqué dans la régulation du NKCC1 lors du développement de l'oedème chez les rats BDL.

4. Expression protéique du NKCC1 et œdème chez les rats BDL

Implication du NKCC1 dans l'œdème

Le co-transporteur NKCC1 est impliqué dans plusieurs pathologies où son expression protéique est associée à l'œdème cérébral. Ceci est plausible parce que son inhibition par la BUM atténue l'augmentation d'eau (Jayakumar, 2011; Lu, 2006; Yan, 2003). Ceci n'est pas surprenant parce que cette protéine transmembranaire est un important régulateur de volume cellulaire et transporte 3 ions (Na^+ , K^+ , 2Cl^-). Avec les résultats du traitement préventif de la BUM, nous avons émis l'hypothèse que le NKCC1 contribue au passage des ions du sang au SNC tôt dans le développement de l'œdème cytotoxique chez les rats BDL. Hypothétiquement, une surexpression du NKCC1 à la membrane aurait induit et maintenu l'accumulation d'ions dans les cellules endothéliales de la BHE. Les ions auraient alors pu être évacués dans l'espace extracellulaire par les Na^+ - K^+ -ATPase ou d'autres transporteurs comme le co-transporteur K-Cl (KCC) (O'Donnell, 2004b). En effet, le KCC transporte un ion de K^+ et un ion de Cl^- vers l'extérieur de la cellule dans l'espace extracellulaire (Kahle, 2010). Enfin, ces ions peuvent être capturés par les astrocytes. Ensuite, l'augmentation de l'osmolarité dans le SNC attire l'eau de l'espace extracellulaire. Afin de compenser la diminution d'eau dans l'espace extracellulaire, l'eau diffuse du sang vers l'espace extracellulaire. Les astrocytes continuent d'absorber les ions et l'eau. Alors, il y aura un gonflement des astrocytes (œdème cytotoxique) et une augmentation d'eau dans le cerveau. Dans le cas de l'insuffisance hépatique chronique, il n'y a pas d'augmentation de pression intracrânienne. Cela suggère que l'augmentation d'eau dans le cerveau n'est pas énorme comparée à celle des cas d'insuffisance hépatique aiguë.

Rôle du NKCC1 dans transport de NH_4^+

Lors d'une hyperammoniémie, le NKCC1 est une des voies que l'ammoniaque (NH_4^+) peut emprunter pour passer la BHE. L'ammoniac (NH_3), en tant que molécule gazeuse, peut diffuser à travers les membranes (Marcaggi, 2001). Dans les cultures d'astrocytes, de neurones et dans des préparations d'hippocampes de souris, Kelly et al. (2010) ont trouvé que le NKCC1 était responsable de 50% de la capture de NH_4^+ dans les astrocytes mais pas dans les neurones. Dans ces derniers, l'influx de NH_4^+ est majoritairement médié par la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Nous proposons que le NKCC1 sur les CMV aident à transporter la NH_4^+ dans l'espace extracellulaire du SNC pour que les astrocytes et les neurones le capturent. Ceci peut expliquer l'implication du NKCC1 sur les neurones et les astrocytes dans la pathogenèse de l'EH minimale.

Le NKCC1 et l'œdème cérébral chez les rats BDL

Dans notre modèle BDL, l'augmentation de la transcription ne corrèle pas avec l'expression génique et la phosphorylation. Cela annule le postulat que l'augmentation de la quantité de protéine sur les CMV et son activation contribuent au maintien de l'entrée excessive d'ions dans l'espace extracellulaire menant à une capture excessive d'ions par les astrocytes. Néanmoins, nous croyons que la BUM injectée par voie i.p. a pu inhiber le NKCC1 sur le côté luminal des CMV avant le développement de l'œdème. Cela aurait pu contribuer à ralentir l'accumulation d'ions lors de l'œdème dont nous avons défini l'origine (cytotoxique). Cependant, à cause de l'effet diurétique, nous ne pouvons quantifier adéquatement l'impact de cette inhibition du NKCC1 par la BUM.

Puisque l'expression protéique et l'activation du NKCC1 ne sont pas impliquées, ces résultats nous donnent des indices sur trois mécanismes possibles de régulation du co-transporteur durant le développement de l'œdème chez les rats BDL. Premièrement, les voies de signalisation régulant le NKCC1 dans l'ischémie ne sont pas actives dans l'EH minimale. Dans l'ischémie cérébrale, l'excitotoxicité résultante active les récepteurs NMDA et cause l'entrée de Ca^{2+} . Cela active une cascade qui aboutira à la surexpression du NKCC1 (Chen, 2005a). Cette cascade impliquerait la phosphorylation

du NKCC, ce qui active le cotransporteur (Flemmer, 2002; Kahle, 2010). Dans les CMV, ceci serait plausible puisque l'expression de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA a été détectée dans les CMV de souris par immunofluorescence (Reijerkerk et al., 2010). Deuxièmement, le stress oxydatif systémique n'active pas le NKCC1 sur les CMV dans l'EH minimale. Troisièmement, le changement de volume cellulaire dans le cortex ne cause pas un stress hyperosmotique suffisant pour activer les kinases WNK (*With No Lysine*) puisque la phosphorylation relative n'a pas augmenté chez les rats BDL comparé aux rats BDL SHAM. Ces kinases détectent les variations de quantité d'eau et activent le NKCC1 afin de contrôler le volume cellulaire (Kahle, 2010). Les résidus, Thr 215 et 217, sont importants pour l'activation du NKCC1 par phosphorylation (Flemmer, 2002). Une augmentation de phosphorylation corrèle avec l'augmentation de l'activité du NKCC1 menant à une prise anormale d'ions par les cellules (Flemmer, 2002; Kahle, 2010). Toutefois, ces trois hypothèses ne sont pas applicables chez les rats BDL puisqu'aucun changement dans l'expression protéique et ni de sa phosphorylation a été relevé. Enfin, l'expression protéique n'a pas fluctué chez les rats PCA. Alors, l'hyperammoniémie chronique n'affecte pas le NKCC1 sur la BHE. La phosphorylation du co-transporteur n'a pas été évaluée chez les rats PCA puisque qu'il n'y a pas d'œdème. Ainsi, l'accumulation d'ions dans l'œdème cytotoxique n'est pas maintenue par une augmentation de l'expression ou de l'activité du NKCC1.

Enfin, le niveau de phosphorylation de NKCC1 a été comparé au niveau de son expression protéique (résultats non-montrés). Il se pourrait que le ratio de NKCC1 phosphorylé contre NKCC1 total augmente chez les rats BDL. Cela aurait expliqué une augmentation d'activité sans augmentation de la quantité de NKCC1 dans les CMV. Cependant, il n'y avait pas de changement significatif entre les rats BDL SHAM et BDL. Alors, nous pouvons conclure que l'augmentation protéique et l'augmentation de la phosphorylation du NKCC1 ne sont pas associées au mécanisme de la prise anormale d'ions dans l'œdème cytotoxique dans l'EH minimale.

Corrélation entre l'expression génique et protéique du NKCC1

Dans cette présente étude, il y a une augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 sans une augmentation de l'expression protéique dans les CMV. Il existe quelques cas semblables où l'expression génique ne corrèle pas avec l'expression protéique. Par exemple, une augmentation d'ARNm de la $\alpha\beta$ -crystalline, une protéine de choc thermique inductible (*Heat shock protein*), a été trouvée dans des cellules épithéliales de souris traitées avec du MG132, un inhibiteur de protéosome, sans augmentation au niveau protéique (Awasthi et al., 2005). Dans le cas de cette présente étude, l'œdème cérébral est associé à une augmentation de la transcription du NKCC1 sans augmentation de l'expression protéique. Cela suggère qu'il y ait une régulation post-transcriptionnelle du NKCC1 qui contrôle son expression protéique dans les CMV chez les rats BDL.

Malgré l'association de l'augmentation d'ARNm codant pour le NKCC1 à l'œdème, aucune hausse de l'expression protéique du NKCC1 a été détectée. De plus, il n'y a pas d'augmentation de sa phosphorylation. Cela implique que l'accumulation d'ions dans l'œdème cytotoxique chez les rats BDL ne peut être expliquée par une augmentation de la protéine du NKCC1 ou par une activation anormale.

5. Stress oxydatif dans la pathogenèse de l'œdème cérébral.

Stress oxydatif chez les rats BDL

L'implication de l'hyperammoniémie chronique indépendamment de d'autres facteurs (présents dans les rats BDL et non pas dans les rats PCA) et du NKCC1 ne sont pas suffisants pour expliquer la pathogenèse de l'œdème cérébral chez les rats BDL. Alors, le centre d'intérêt de l'étude est devenu le stress oxydatif systémique, une condition où la production de radicaux libres oxygénés (ROS) dépasse leur élimination. Cliniquement, le stress oxydatif dans le sang est détecté lors de l'insuffisance hépatique chronique (Jain et al., 2002; Yamamoto et al., 1998). Chez les rats BDL, le stress oxydatif est une caractéristique évidente dans le sang (Bosoi, 2011a; Orellana et al., 2000). Le déséquilibre oxydant/antioxydant n'est pas présent chez les rats PCA (Yang, 2010).

Implication du stress oxydatif

L'implication du stress oxydatif dans l'œdème cérébral chez les rats BDL n'a pas été complètement élucidée dans cette présente étude. Il n'y a pas d'augmentation du niveau de stress oxydatif dans le LCR chez les rats BDL comparé aux SHAM. Alors, les concentrations plasmatiques du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (150-250 μM) ne sont pas suffisantes pour induire le stress oxydatif dans le SNC chez les rats BDL et les rats PCA, contrairement à ce qui est observé dans les astrocytes des études *in vitro* (5 mM $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) (Jayakumar, 2008). L'AST-120 atténue l'hyperammoniémie et l'œdème cérébral chez les rats BDL mais le niveau de stress oxydatif ne change pas (Bosoi, 2011a). De plus, le traitement d'AST-120 a été commencé dès la première journée suite à l'opération. Alors, le stress oxydatif sans hyperammoniémie (atténuée par l'AST-120) ne peut induire l'œdème cérébral chez les rats BDL. Nos résultats montrent que la BUM diminue l'hyperammoniémie et l'œdème cérébral en parallèle. Tout comme l'AST-120,

le niveau de stress oxydatif dans le plasma ne varie pas après un traitement à la BUM. Ceci est une seconde preuve que le stress oxydatif dans le plasma sans hyperammoniémie chez les rats BDL n'induit pas l'œdème. Toutefois, il se peut que le stress oxydatif soit un facteur précipitant dans la pathogenèse de l'EH minimale, c'est-à-dire qu'il favorise l'apparition de l'œdème en présence d'hyperammoniémie chronique. En effet, chez les rats BDL, il est présent avec l'hyperammoniémie lors de l'apparition de l'œdème cérébral mais si la concentration du NH_3 dans le sang diminue, l'œdème cérébral n'est plus détectable.

Carbonylation

L'hypothèse que la présence anormale de ROS dans la circulation sanguine puisse perturber les cellules endothéliales de la BHE a été posée. La carbonylation des chaînes latérales des acides aminés des protéines est un marqueur de dégradation de protéines et on retrouve une augmentation de la carbonylation de l'albumine chez les patients cirrhotiques (Oettl et al., 2008). La détection de la carbonylation est aussi un moyen de quantifier le dommage causé par le stress oxydatif (Varsila et al., 1995). Les lysats des CMV utilisés contiennent la fraction cytosolique et membranaire des cellules endothéliales, contenant donc à la fois les protéines membranaires du côté luminal (exposé aux ROS dans le plasma) et les protéines cytosoliques. Nos résultats prouvent qu'il n'y a pas une augmentation de carbonylation des protéines des CMV chez les rats BDL comparé aux SHAM malgré la présence de stress oxydatif, d'hyperammoniémie et d'œdème cérébral. Ceci est un indice que le stress oxydatif même en présence d'hyperammoniémie dans la cirrhose du foie n'affecte pas la BHE. Ceci est logique parce que des dommages à la BHE peuvent favoriser le passage des ROS au SNC. Or, il n'y a pas d'élévation du stress oxydatif dans le SNC : la BHE maintient les ROS dans le sang. C'est un autre indice que l'intégrité de la BHE est conservée et qu'il doit y avoir une augmentation de la défense antioxydante au niveau de la BHE prévenant le dommage par les ROS. En effet, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut servir d'exemple. Ce radical libre a une longue demi-vie et peut passer à travers les membranes (Dröge, 2002). Dans notre modèle BDL, les CMV doivent avoir une augmentation de leur

système antioxydant (expression d'enzymes antioxydantes) pour éviter la carbonylation des protéines en dépit d'une élévation de ROS dans le plasma. Le niveau de carbonylation des protéines n'a pas été évalué chez les rats PCA puisqu'il n'y avait pas d'augmentation de stress oxydatif systémique.

L'effet thérapeutique de l'AST-120 consiste en une adsorption du $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ tandis que celui de la BUM est un effet diurétique. Ces traitements confirment que l'hyperammoniémie joue un rôle important dans la pathogenèse de l'œdème cérébral. Toutefois, cette condition chez les rats PCA n'induit pas l'œdème cérébral. Il doit alors y avoir un autre facteur et qui n'est pas une activation excessive du NKCC1 et ni le stress oxydatif. D'un autre côté, la relation entre l'hyperammoniémie et le stress oxydatif nécessite des enquêtes plus poussées étant donné que ces deux facteurs sont présents avec l'œdème cérébral entre la 5^{ème} et 6^{ème} semaine chez les rats BDL. Nous proposons l'hypothèse que ces deux facteurs aient une action synergique dans la pathogenèse de l'EH minimale.

6. Études futures

En général, le projet a tenté d'élucider le mécanisme de la pathogenèse de l'œdème cérébral en se concentrant sur la BHE. De futures expériences sont nécessaires afin d'enrichir cette étude.

Microvaisseaux sanguins cérébraux

Le protocole présentement établi nécessite le cortex cérébral, le cervelet et le tronc cérébral pour isoler suffisamment de CMV pour les expériences. Il serait intéressant d'optimiser le protocole d'isolement des CMV afin de récolter plus de cellules endothéliales en limitant les pertes pour étudier des régions plus spécifiques, telles que le cortex préfrontal ou le cervelet seulement.

NKCC1

L'augmentation de la transcription génique du NKCC1 a été associée à l'œdème cérébral mais son rôle dans la pathogenèse n'a pas été défini. Il a été suggéré que la transcription génique est augmentée lors de l'œdème cérébral. Pour vérifier cela, il faut étudier l'expression génique de d'autres gènes susceptibles d'être impliqués dans le développement de l'œdème cérébral. La transcription de d'autres protéines transmembranaires pourrait être étudiée. Par exemple, il y a les KCC, un cotransporteur de K^+ et de Cl^- , les aquaporines ou le $Na^+-K^+-ATPase$. Dans le cas où aucune augmentation de transcription ne serait détectée, il faudrait chercher pourquoi le gène du NKCC1 est ciblé en particulier. Nous avons aussi émis l'hypothèse que les facteurs pro-inflammatoires et l'hyperammoniémie soient associés à l'augmentation de transcription chez les rats BDL. L'inflammation peut être induite chez les rats PCA en injectant du LPS. Cette hypothèse serait vérifiée si des variations dans l'expression génique du NKCC1 sont détectées chez ces rats.

Nous avons pu définir que l'origine de l'œdème (cytotoxique) mais nous n'avons pas pu cerner l'implication du NKCC1. D'autres protéines pourraient expliquer le

mécanisme cytotoxique du déséquilibre dans le cortex. Par exemple, la Na⁺-K⁺-ATPase, les canaux de K⁺ et les KCC sont des protéines pouvant transporter les ions de K⁺ et le NH₄⁺.

Thérapies pour l'EH

Le ciblage de NKCC1 comme stratégie thérapeutique n'est pas encore assez bien étudié. En effet, la BUM ne peut être utilisée pour réduire l'œdème cérébral chez les patients cirrhotiques. Selon notre étude, il faudrait prévoir l'apparition de l'œdème cérébral avant d'administrer une dose suffisante de BUM pour minimiser les effets diurétiques. Toutefois, l'AST-120 serait une solution intéressante pour diminuer le niveau de NH₃/NH₄⁺. Cet effet de diminution a été efficace pour réduire l'œdème. D'autres études sont nécessaires afin de développer une thérapie ciblant NKCC1 dans la BHE pour atténuer un œdème cytotoxique.

Hyperammoniémie et stress oxydatif

L'étude a montré que le stress oxydatif seul ne cause pas l'œdème cérébral en présence d'hyperammoniémie et n'augmente pas la carbonylation des protéines des CMV. Néanmoins, les rats BDL souffrent d'œdème cérébral lorsque l'hyperammoniémie et le stress oxydatif sont présents ensemble. Pour mieux définir le rôle du stress oxydatif chez les rats BDL, l'atténuation de celui-ci serait nécessaire. En effet, des traitements antioxydants (allopurinol, vitamine E) pourraient être administrés chez les rats BDL. Cela va créer une situation où le stress oxydatif est diminué mais où l'hyperammoniémie est encore présente. En d'autres mots, cela serait une condition contraire aux traitements de l'AST-120 et de la BUM. Une deuxième possibilité serait d'induire le stress oxydatif chez les rats PCA et d'étirer la période du modèle de 4 semaines à 6 semaines, pour imiter celle des rats BDL. S'il y a un effet synergique entre NH₃/NH₄⁺ et le stress oxydatif, nous nous attendrions à voir l'œdème diminuer chez les rats BDL, où les ROS auront été diminués. Chez les rats PCA, nous nous attendons à observer l'œdème cérébral suite à une induction de stress oxydatif. Ces études sont présentement en cours de réalisation dans le laboratoire du Dr. Rose.

Nous avons démontré que le stress oxydatif n'affectait pas les CMV (carbonylation) malgré la présence d'hyperammoniémie. D'autres marqueurs de stress oxydatif comme la nitration des résidus tyrosine des protéines pourraient être évalués afin de réaffirmer fermement cette conclusion. L'immunoprécipitation du NKCC1 est une possibilité intéressante. Cela permet l'étude des effets des ROS sur la structure du NKCC1. Nous nous attendrions à voir que les ROS ne modifient pas le NKCC1 et cela va appuyer l'hypothèse que le stress oxydatif n'affecte pas les protéines de la BHE. Enfin, si le rôle de l'hyperammoniémie et du stress oxydatif ne sont pas suffisants pour expliquer le développement de l'œdème cérébral, d'autres facteurs chez les rats BDL pourraient être étudiés notamment les facteurs d'inflammation comme le TNF- α .

7. Résumé de l'étude

Pour conclure, l'étude présente a permis de mieux comprendre la pathologie de l'EH minimale. L'œdème cérébral chez les rats BDL est d'origine cytotoxique. Cependant, son mécanisme n'a pas pu être élucidé. Néanmoins, selon les résultats des traitements à l'AST-120 et la BUM, l'hyperammoniémie reste un facteur central dans la pathogenèse de ce dernier, mais elle n'affecte pas la BHE lorsqu'elle est présente seule (PCA). L'implication du NKCC1 et du stress oxydatif dans la pathogenèse de l'œdème cérébral n'a pas été complètement élucidée.

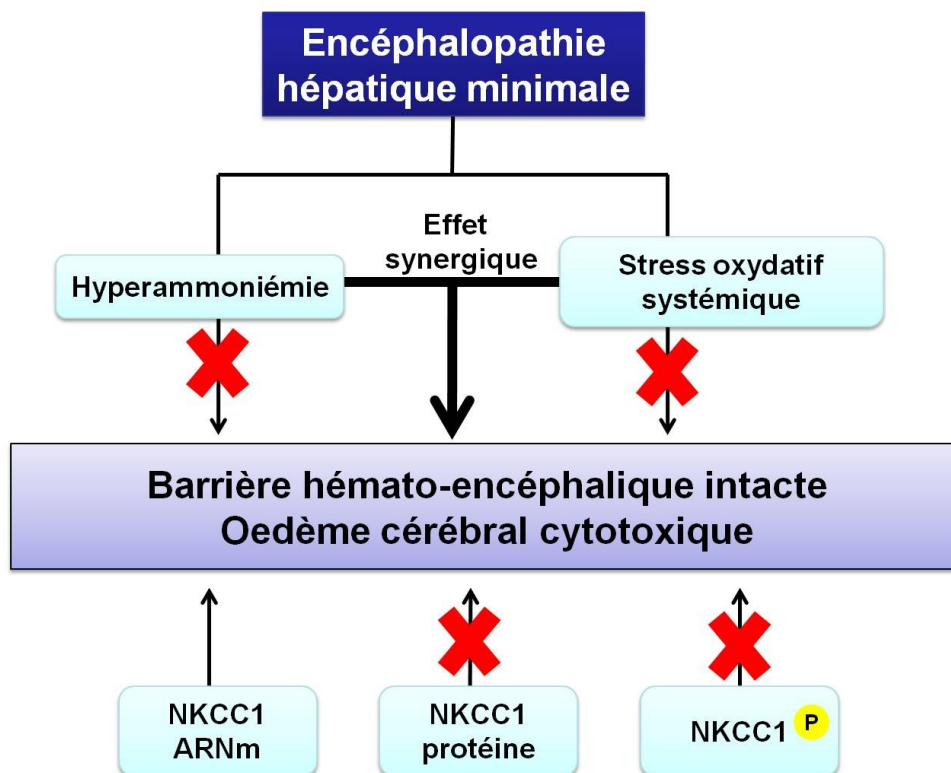


Figure 39. Résumé des conclusions de l'étude

L'œdème cérébral chez les rats BDL est d'origine cytotoxique. Le NKCC1 et le stress oxydatif comme facteur indépendant ne contribuent pas à son développement. Chez les rats PCA, l'hyperammoniémie chronique et indépendante n'altère pas l'intégrité de la BHE.

Références

Abbott, N.J., 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol*, 20(2):131-147.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L. & Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci*, 7(1):41-53.

Allt, G. & Lawrenson, J.G., 2001. Pericytes: Cell Biology and Pathology. *Cells Tissues Organs*, 169(1):1-11.

Andersen, G.Ø., Skomedal, T., Enger, M., Fidjeland, A., Brattelid, T., Levy, F.O. & Osnes, J.-B., 2004. Alpha1-AR-mediated activation of NKCC in rat cardiomyocytes involves ERK-dependent phosphorylation of the cotransporter. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 286(4):H1354-1360.

Anselmo, A.N., Earnest, S., Chen, W., Juang, Y.-C., Kim, S.C., Zhao, Y. & Cobb, M.H., 2006. WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103(29):10883-10888.

Apel, K. & Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55:373-399.

Arebalo, R.E., Hardgrave, J.E., Noland, B.J. & Scallen, T.J., 1980. In vivo regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase: enzyme phosphorylation as an early regulatory response after intragastric administration of mevalonolactone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 77(11):6429-6433.

Avery, S.V., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem. J*, 434(2):201-210.

Awasthi, N. & Wagner, B.J., 2005. Upregulation of heat shock protein expression by proteasome inhibition: an antiapoptotic mechanism in the lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 46(6):2082-2091.

Bajaj, J.S., 2010. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment. Pharmacol. Ther*, 31(5):537-547.

Bajaj, J.S., Saeian, K., Hafeezullah, M., Hoffmann, R.G. & Hammeke, T.A., 2008. Patients with minimal hepatic encephalopathy have poor insight into their driving skills. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, 6(10):1135-1139;

- Bak, L.K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 98(3):641-653.
- Balabanov, R. & Dore-Duffy, P., 1998. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience Research*, 53(6):637-644.
- Bass, N.M., Mullen, K.D., Sanyal, A., Poordad, F., Neff, G., Leevy, C.B., Sigal, S., Sheikh, M.Y., Beavers, K., Frederick, T., Teperman, L., Hillebrand, D., Huang, S., Merchant, K., Shaw, A., Bortey, E. & Forbes, W.P., 2010. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N. Engl. J. Med*, 362(12):1071-1081.
- Beauchesne, E., Desjardins, P., Hazell, A.S. & Butterworth, R.F., 2009. Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem. Int*, 55(5):275-281.
- Blei, A.T., Olafsson, S., Therrien, G. & Butterworth, R.F., 1994. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*, 19(6):1437-1444.
- Bosoi, C.R. & Rose, C.F., 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis*, 24(1):95-102.
- Bosoi, C.R., Parent-Robitaille, C., Anderson, K., Tremblay, M. & Rose, C.F., 2011a. AST-120 (spherical carbon adsorbent) lowers ammonia levels and attenuates brain edema in bile-duct ligated rats. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.24273.
- Bosoi, C.R., Yang, X., Parent-Robitaille, C., Tremblay, M. & Rose, C., 2011b. Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in chronic liver failure: Evidence from 2 animal models of hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 53:1995-2002.
- Brachvogel, B., Pausch, F., Farlie, P., Gaipl, U., Etich, J., Zhou, Z., Cameron, T., von der Mark, K., Bateman, J.F. & Pöschl, E., 2007. Isolated Anxa5+/Sca-1+ perivascular cells from mouse meningeal vasculature retain their perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res*, 313(12):2730-2743.
- Brandt, C., Nozadze, M., Heuchert, N., Rattka, M. & Löscher, W., 2010. Disease-Modifying Effects of Phenobarbital and the NKCC1 Inhibitor Bumetanide in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci*, 30(25):8602 -8612.
- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Michaud, J., Lavoie, J. & Layrargues, G.P., 1987. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol*, 6(1-2):1-12.
- Butterworth, R.F., 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis*, 17(4):221-227.

Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A., 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15(1):7-10.

Candelario-Jalil, E., Yang, Y. & Rosenberg, G.A., 2009. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3):983-994.

Candelario-Jalil, E., Taheri, S., Yang, Y., Sood, R., Grossetete, M., Estrada, E.Y., Fiebich, B.L. & Rosenberg, G.A., 2007. Cyclooxygenase Inhibition Limits Blood-Brain Barrier Disruption following Intracerebral Injection of Tumor Necrosis Factor- α in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 323(2):488 -498.

Cardoso, F.L., Brites, D. & Brito, M.A., 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*, 64(2):328-363.

Cauli, O., Llansola, M., Erceg, S. & Felipo, V., 2006. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J. Hepatol*, 45(5):654-661.

Chan, C.-Y., Huang, S.-W., Wang, T.-F., Lu, R.-H., Lee, F.-Y., Chang, F.-Y., Chu, C.-J., Chen, Y.-C., Chan, C.-C., Huang, H.-C. & Lee, S.-D., 2004. Lack of detrimental effects of nitric oxide inhibition in bile duct-ligated rats with hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest*, 34(2):122-128.

Chavarria, L., Oria, M., Romero-Gimenez, J., Alonso, J., Lope-Piedrafita, S. & Cordoba, J., 2010. Diffusion Tensor Imaging Supports the Cytotoxic Origin of Brain Edema in a Rat Model of Acute Liver Failure. *Gastroenterology*, 138(4):1566-1573.

Chen, B.P., 1996. Loop diuretics: comparison of torsemide, furosemide, and bumetanide. *Conn Med*, 60(6):343-345.

Chen, F., Ohashi, N., Li, W., Eckman, C. & Nguyen, J.H., 2009. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology*, 50(6):1914-1923.

Chen, H. & Sun, D., 2005a. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurol. Res*, 27(3):280-286.

Chen, H., Luo, J., Kintner, D.B., Shull, G.E. & Sun, D., 2005b. Na(+)-dependent chloride transporter (NKCC1)-null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 25(1):54-66.

Chung, C., Gottstein, J. & Blei, A.T., 2001. Indomethacin prevents the development of experimental ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*, 34(2):249-254.

Claudio, L., 1995. Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathologica*, 91(1):6-14.

Clemmesen, J.O., Larsen, F.S., Kondrup, J., Hansen, B.A. & Ott, P., 1999. Cerebral herniation in patients with acute E liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology*, 29(3):648-653.

Córdoba, J., Alonso, J., Rovira, A., Jacas, C., Sanpedro, F., Castells, L., Vargas, V., Margarit, C., Kulisevsky, J., Esteban, R. & Guardia, J., 2001. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J. Hepatol*, 35(5):598-604.

Cordoba, J., Gottstein, J. & Blei, A.T., 1996. Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology*, 24(4):919-923.

Córdoba, J., Crespin, J., Gottstein, J. & Blei, A.T., 1999. Mild hypothermia modifies ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Gastroenterology*, 116(3):686-693.

Cossins, J.A., Clements, J.M., Ford, J., Miller, K.M., Pigott, R., Vos, W., Van Der Valk, P. & De Groot, C.J.A., 1997. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica*, 94(6):590-598.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A., 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4):169-176.

Davies, N.A., Wright, G., Ytrebø, L.M., Stadlbauer, V., Fuskevåg, O.-M., Zwingmann, C., Davies, D.C., Habtesion, A., Hodges, S.J. & Jalan, R., 2009. L-ornithine and phenylacetate synergistically produce sustained reduction in ammonia and brain water in cirrhotic rats. *Hepatology*, 50(1):155-164.

Desjardins, P., Rao, K.V., Michalak, A., Rose, C. & Butterworth, R.F., 1999. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis*, 14(4):273-280.

Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1):47 -95.

Dzwonek, J., Rylski, M. & Kaczmarek, L., 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett*, 567(1):129-135.

Eizayaga, F., Scorticati, C., Prestifilippo, J.-P., Romay, S., Fernandez, M.-A., Castro, J.-L., Lemberg, A. & Perazzo, J.-C., 2006. Altered blood-brain barrier permeability in rats with prehepatic portal hypertension turns to normal when portal pressure is lowered. *World J. Gastroenterol*, 12(9):1367-1372.

Engelhardt, B. & Sorokin, L., 2009. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, 31(4):497-511.

Faropoulos, K., Chroni, E., Assimakopoulos, S.F., Mavrakis, A., Stamatopoulou, V., Toumpeki, C., Drainas, D., Grintzalis, K., Papapostolou, I., Georgiou, C.D. & Konstantinou, D., 2010. Altered occludin expression in brain capillaries induced by obstructive jaundice in rats. *Brain Res*, 1325:121-127.

Felipo, V. & Butterworth, R.F., 2002. Mitochondrial dysfunction in acute hyperammonemia. *Neurochemistry International*, 40(6):487-491.

Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K. & Blei, A.T., 2002. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*, 35(3):716-721.

Findley, M.K. & Koval, M., 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*, 61(4):431-437.

Finkel, T. & Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809):239-247.

Fisher, M., 2009. Pericyte Signalling in the Neurovascular Unit. *Stroke*, 40(3 Suppl):S13-S15.

Flemmer, A.W., Gimenez, I., Dowd, B.F.X., Darman, R.B. & Forbush, B., 2002. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J. Biol. Chem*, 277(40):37551-37558.

Flemmer, A.W., Monette, M.Y., Djuricic, M., Dowd, B., Darman, R., Gimenez, I. & Forbush, B., 2010. Phosphorylation state of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. *J. Exp. Biol*, 213(Pt 9):1558-1566.

Furuse, M., 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(1). doi:10.1101/cshperspect.a002907.

Gasche, Y., Copin, J.C., Sugawara, T., Fujimura, M. & Chan, P.H., 2001. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 21(12):1393-1400.

Gasche, Y., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Copin, J.C., Kawase, M., Massengale, J. & Chan, P.H., 1999. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 19(9):1020-1028.

Geng, Y., Hoke, A. & Delpire, E., 2009. The Ste20 kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase and oxidative-stress response 1 regulate NKCC1 function in sensory neurons. *J. Biol. Chem*, 284(21):14020-14028.

Giboney, P.T., 2005. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician*, 71(6):1105-1110.

Gonzalez, F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *J. Mutat Res-Fund Mol M*, 569(1-2):101-110.

Görg, B., Qvarthava, N., Bidmon, H.-J., Palomero-Gallagher, N., Kircheis, G., Zilles, K. & Häussinger, D., 2010. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 52(1):256-265.

Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S. & Louvard, D., 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93(20):10779-10784.

Groger, M., Lebesgue, D., Pruneau, D., Relton, J., Kim, S.-W., Nussberger, J. & Plesnila, N., 2005. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(8):978-989.

Guerit, J.-M., Amantini, A., Fischer, C., Kaplan, P.W., Mecarelli, O., Schnitzler, A., Ubiali, E. & Amodio, P., 2009. Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int*, 29(6):789-796.

Haas, M., 1994. The Na-K-Cl cotransporters. *Am. J. Physiol*, 267(4 Pt 1):C869-885.

Haas, M. & McManus, T.J., 1983. Bumetanide inhibits (Na + K + 2Cl) co-transport at a chloride site. *Am. J. Physiol*, 245(3):C235-240.

Haas, M. & Forbush, B., 1998. The Na-K-Cl Cotransporter. *J. Bioenerg Biomembr*, 30(2):161-172.

el Hafny, B., Bourre, J.M. & Roux, F., 1996. Synergistic stimulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol*, 167(3):451-460.

- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59(5):1609-1623.
- Hannaert, P., Alvarez-Guerra, M., Pirot, D., Nazaret, C. & Garay, R.P., 2002. Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 365(3):193-199.
- Haorah, J., Knipe, B., Gorantla, S., Zheng, J. & Persidsky, Y., 2007. Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *J. Neurochem*, 100(2):324-336.
- Hartmann, I.J., Groeneweg, M., Quero, J.C., Beijeman, S.J., de Man, R.A., Hop, W.C. & Schalm, S.W., 2000. The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *Am. J. Gastroenterol*, 95(8):2029-2034.
- Hassett, D. & Cohen, M., 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *The FASEB Journal*, 3(14):2574 - 2582.
- Haukeland, J.W., Lorgen, I., Schreiner, L.T., Frigstad, S.-oskar, Brandsæter, B., Bjøro, K., Bang, C., Raknerud, N. & Konopski, Z., 2007. Incidence rates and causes of cirrhosis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol*, 42(12):1501-1508.
- Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F. & vom Dahl, S., 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol*, 32(6):1035-1038.
- Häussinger, D., Laubenberger, J., vom Dahl, S., Ernst, T., Bayer, S., Langer, M., Gerok, W. & Hennig, J., 1994. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 107(5):1475-1480.
- Häussinger, D., 2006. Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 43(6):1187-1190.
- Häussinger, D. & Schliess, F., 2008. Pathogenetic mechanism of hepatic encephalopathy. *Gut*, 57:1156-1165.
- Hawkins, B.T. & Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev*, 57(2):173-185.
- Hawkins, B.T., Abbruscato, T.J., Egleton, R.D., Brown, R.C., Huber, J.D., Campos, C.R. & Davis, T.P., 2004. Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. *Brain Res*, 1027(1-2):48-58.

Hayashi, M., Ohnishi, H., Kawade, Y., Muto, Y. & Takahashi, Y., 1981. Augmented utilization of branched-chain amino acids by skeletal muscle in decompensated liver cirrhosis in special relation to ammonia detoxication. *Gastroenterol. Jpn*, 16(1):64-70.

Helaly, G.F., 2011. Differences in circulating MMP-9 levels with regard to viral load and AST:ALT ratio between chronic hepatitis B and C patients. *Br. J. Biomed. Sci*, 68(1):38-42.

Hiraishi, M., 1987. The effect of oral adsorbent on surgically induced hepatic failure. *Jpn J Surg.*, 17:517-527.

Huang, C.-H. & Ye, M., 2009. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology, and disease association. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(8):1203-1218.

Huang, C.-L., Yang, S.-S. & Lin, S.-H., 2008. Mechanism of regulation of renal ion transport by WNK kinases. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 17(5):519-525.

Huang, L.-T., Hsieh, C.-S., Chou, M.-H., Chuang, J.-H., Liou, C.-W., Tiao, M.-M. & Lai, M.-C., 2004. Obstructive jaundice in rats: cause of spatial memory deficits with recovery after biliary decompression. *World J Surg*, 28(3):283-287.

Igarashi, Y., Utsumi, H., Chiba, H., Yamada-Sasamori, Y., Tobioka, H., Kamimura, Y., Furuuchi, K., Kokai, Y., Nakagawa, T., Mori, M. & Sawada, N., 1999. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Induces Barrier Function of Endothelial Cells Forming the Blood-Brain Barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(1):108-112.

Isenring, P. & Forbush, B., 3rd, 1997. Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J. Biol. Chem*, 272(39):24556-24562.

Isenring, P., Jacoby, S.C. & Forbush, B., 3rd, 1998a. The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 95(12):7179-7184.

Isenring, P., Jacoby, S.C., Chang, J. & Forbush, B., 1998b. Mutagenic Mapping of the Na-K-Cl Cotransporter for Domains Involved in Ion Transport and Bumetanide Binding. *The Journal of General Physiology*, 112(5):549 -558.

Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F. & Stein, D.G., 2010. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp. Neurol*, 226(1):183-190.

Jaeschke, H., 2011. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol*, 26 Suppl 1:173-179.

Jain, S.K., Pemberton, P.W., Smith, A., McMahon, R.F.T., Burrows, P.C., Aboutwerat, A. & Warnes, T.W., 2002. Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J of Hepatol*, 36(6):805-811.

Jalan, R. & Kapoor, D., 2003. Enhanced renal ammonia excretion following volume expansion in patients with well compensated cirrhosis of the liver. *Gut*, 52(7):1041-1045.

Jalan, R., Wright, G., Davies, N.A. & Hodges, S.J., 2007. L-Ornithine phenylacetate (OP): A novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*, 69(5):1064-1069.

Jaumot, M. & Hancock, J.F., 2001. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene*, 20(30):3949-3958.

Javaheri, S., Davis, C. & Rogers, D.H., 1993. Ionic composition of cisternal CSF in acute respiratory acidosis: lack of effect of large dose bumetanide. *J. Neurochem*, 61(4):1525-1529.

Jayakumar, A.R. & Norenberg, M.D., 2010. The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling. *Metab Brain Dis*, 25(1):31-38.

Jayakumar, A.R., Liu, M., Moriyama, M., Ramakrishnan, R., Forbush, B., Reddy, P.V.B. & Norenberg, M.D., 2008. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J. Biol. Chem*, 283(49):33874-33882.

Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Tong, X.Y. & Norenberg, M.D., 2009. Calcium in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J. Neurochem*, 109 Suppl 1:252-257.

Jayakumar, A.R., Valdes, V. & Norenberg, M.D., 2011. The Na-K-Cl cotransporter in the brain edema of acute liver failure. *J. Hepatol*, 54(2):272-278.

Jiao, H., Wang, Z., Liu, Y., Wang, P. & Xue, Y., 2011. Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and ZO-1 of the Blood-Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic Insult. *J Mol Neurosci*. doi:10.1007/s12031-011-9496-4.

Jover, R., Madaria, E., Felipo, V., Rodrigo, R., Candela, A. & Compañ, A., 2005. Animal models in the study of episodic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Metab Brain Dis*, 20(4):399-408.

Kago, T., Takagi, N., Date, I., Takenaga, Y., Takagi, K. & Takeo, S., 2006. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 339(4):1197-1203.

Kahle, K.T., Rinehart, J. & Lifton, R.P., 2010. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802(12):1150-1158.

Kahle, K.T., Simard, J.M., Staley, K.J., Nahed, B.V., Jones, P.S. & Sun, D., 2009. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)*, 24:257-265.

Kale, R.A., Gupta, R.K., Saraswat, V.A., Hasan, K.M., Trivedi, R., Mishra, A.M., Ranjan, P., Pandey, C.M. & Narayana, P.A., 2006. Demonstration of interstitial cerebral edema with diffusion tensor MR imaging in type C hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 43(4):698-706.

Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T., 2000. *Principles of Neural Science* 4^e éd., Mcgraw-Hill.

Kaplan, M.R., Mount, D.B. & Delpire, E., 1996. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu. Rev. Physiol*, 58:649-668.

Kaya, M., Kalayci, R., Küçük, M., Arican, N., Elmas, I., Kudat, H. & Korkut, F., 2003. Effect of losartan on the blood-brain barrier permeability in diabetic hypertensive rats. *Life Sci*, 73(25):3235-3244.

Keicher, E. & Meech, R., 1994. Endogenous Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾ (or NH₄⁽⁺⁾)-2Cl⁽⁻⁾ cotransport in *Rana* oocytes; anomalous effect of external NH₄⁽⁺⁾ on pHi. *J. Physiol. (Lond.)*, 475(1):45-57.

Kelly, T. & Rose, C.R., 2010. Ammonium influx pathways into astrocytes and neurones of hippocampal slices. *J. Neurochem*, 115(5):1123-1136.

Kim, K.C. & Lee, C.H., 2005. MAP Kinase activation is required for the MMP-9 induction by TNF-stimulation. *Arch Pharm Res*, 28(11):1257-1262.

Klatzo, I., 1987. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*, 72(3):236-239.

Kniesel, U. & Wolburg, H., 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol*, 20(1):57-76.

Kountouras, J., Billing, B.H. & Scheuer, P.J., 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65(3):305-311.

Kozler, P. & Pokorný, J., 2003. Altered blood-brain barrier permeability and its effect on the distribution of Evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. *Physiol Res*, 52(5):607-614.

Krizbai, I.A., Lenzser, G., Szatmari, E., Farkas, A.E., Wilhelm, I., Fekete, Z., Erdos, B., Bauer, H., Bauer, H.-C., Sandor, P. & Komjati, K., 2005. Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. *Shock*, 24(5):428-433.

Kullmann, F., Hollerbach, S., Holstege, A. & Schölmerich, J., 1995. Subclinical hepatic encephalopathy: the diagnostic value of evoked potentials. *J. Hepatol*, 22(1):101-110.

Kundra, A., Jain, A., Banga, A., Bajaj, G. & Kar, P., 2005. Evaluation of plasma ammonia levels in patients with acute liver failure and chronic liver disease and its correlation with the severity of hepatic encephalopathy and clinical features of raised intracranial tension. *Clinical Biochemistry*, 38(8):696-699.

Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T. & Ferdinandy, P., 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 61(2):205-209.

Lai, J.C. & Cooper, A.J., 1986. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem*, 47(5):1376-1386.

Lam, T.I., Anderson, S.E., Glaser, N. & O'Donnell, M.E., 2005. Bumetanide reduces cerebral edema formation in rats with diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, 54(2):510-516.

Larsen, F.S. & Wendon, J., 2008. Prevention and management of brain edema in patients with acute liver failure. *Liver Transplantation*, 14(S2):S90-S96.

Lavoie, J., Giguère, J.F., Layrargues, G.P. & Butterworth, R.F., 1987. Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J. Neurochem*, 49(3):692-697.

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

Lee, S.H., Lee, M.G. & Kim, N.D., 1994. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide after intravenous and oral administration to rats: absorption from various GI segments. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 22(1):1-17.

Lee, S.-W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.-J. & Kim, K.-W., 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*, 9(7):900-906.

Liedtke, C.M., Hubbard, M. & Wang, X., 2003. Stability of actin cytoskeleton and PKC-delta binding to actin regulate NKCC1 function in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*, 284(2):C487-496.

Lim, H. & Kim, H.P., 2011. Matrix metalloproteinase-13 expression in IL-1 β -treated chondrocytes by activation of the p38 MAPK/c-Fos/AP-1 and JAK/STAT pathways. *Arch. Pharm. Res*, 34(1):109-117.

Lockwood, A.H., 2004. Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 19(3-4):345-349.

Lodi, R., Tonon, C., Stracciari, A., Weiger, M., Camaggi, V., Iotti, S., Donati, G., Guarino, M., Bolondi, L. & Barbiroli, B., 2004. Diffusion MRI shows increased water apparent diffusion coefficient in the brains of cirrhotics. *Neurology*, 62(5):762-766.

Loguercio, C., De Girolamo, V., Federico, A., Feng, S.L., Crafa, E., Cataldi, V., Gialanella, G., Moro, R. & Del Vecchio Blanco, C., 2001. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease. *Biol Trace Elem Res*, 81(3):245-254.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193(1):265-275.

Lu, K.-T., Cheng, N.-C., Wu, C.-Y. & Yang, Y.-L., 2008. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade. *Crit. Care Med*, 36(3):917-922.

Lu, K.-T., Wu, C.-Y., Cheng, N.-C., Wo, Y.-Y.P., Yang, J.-T., Yen, H.-H. & Yang, Y.-L., 2006. Inhibition of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter in choroid plexus attenuates traumatic brain injury-induced brain edema and neuronal damage. *Eur J Pharmacol*, 548(1-3):99-105.

Lu, K.-T., Wu, C.-Y., Yen, H.-H., Peng, J.-H.F., Wang, C.-L. & Yang, Y.-L., 2007. Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurol. Res*, 29(4):404-409.

Lukes, A., Mun-Bryce, S., Lukes, M. & Rosenberg, G.A., 1999. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol. Neurobiol*, 19(3):267-284.

Lytle, C. & Forbush, B., 3rd, 1992. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem*, 267(35):25438-25443.

Marcaggi, P. & Coles, J.A., 2001. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. *Prog Neurobiol*, 64(2):157-183.

Marchesini, G., Zoli, M., Dondi, C., Angiolini, A., Melli, A. & Pisi, E., 1982. Ammonia-induced changes in pancreatic hormones and plasma amino acids in patients with liver cirrhosis. *Dig. Dis. Sci*, 27(5):406-412.

- Mardini, H., Smith, F.E., Record, C.O. & Blamire, A.M., 2010. Magnetic resonance quantification of water and metabolites in the brain of cirrhotics following induced hyperammonaemia. *J Hepatol*. doi:10.1016/j.jhep.2010.09.030.
- Marmarou, A., Poll, W., Shulman, K. & Bhagavan, H., 1978. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg*, 49(4):530–537.
- Master, S., Gottstein, J. & Blei, A.T., 1999. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology*, 30(4):876-880.
- McCrea, M., Cordoba, J., Vessey, G., Blei, A.T. & Randolph, C., 1996. Neuropsychological characterization and detection of subclinical hepatic encephalopathy. *Arch. Neurol*, 53(8):758-763.
- McMinn, P., Stratov, I., Nagarajan, L. & Davis, S., 2001. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin. Infect. Dis*, 32(2):236-242.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M.A., Arias, J. & Arias, J.L., 2009. Associative learning deficit in two experimental models of hepatic encephalopathy. *Behav. Brain Res*, 198(2):346-351.
- Menzies, S.A., Betz, A.L. & Hoff, J.T., 1993. Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema. *J. Neurosurg*, 78(2):257-266.
- Michalak, A., Rose, C., Butterworth, J. & Butterworth, R.F., 1996. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology*, 24(4):908-913.
- Miese, F., Kircheis, G., Wittsack, H.J., Wenserski, F., Hemker, J., Mödder, U., Häussinger, D. & Cohnen, M., 2006. 1H-MR spectroscopy, magnetization transfer, and diffusion-weighted imaging in alcoholic and nonalcoholic patients with cirrhosis with hepatic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27(5):1019-1026.
- Miller, E.K. & Cohen, J.D., 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci*, 24:167-202.
- Moriwaki, H., Shiraki, M., Iwasa, J. & Terakura, Y., 2010. Hepatic encephalopathy as a complication of liver cirrhosis: an Asian perspective. *J. Gastroenterol. Hepatol*, 25(5):858-863.
- de Moura, M.B., dos Santos, L.S. & Van Houten, B., 2010. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Environ. Mol. Mutagen*, 51(5):391-405.

- Mousseau, D.D. & Butterworth, R.F., 1994. Current theories on the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 206(4):329-344.
- Mumtaz, K., Ahmed, U.S., Abid, S., Baig, N., Hamid, S. & Jafri, W., 2010. Precipitating factors and the outcome of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *J Coll Physicians Surg Pak*, 20(8):514-518.
- Murrell, G.A., Francis, M.J. & Bromley, L., 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 265(3):659-665.
- Nag, S., Manias, J.L. & Stewart, D.J., 2009. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol*, 118(2):197-217.
- Nguyen, J.H., Yamamoto, S., Steers, J., Sevlever, D., Lin, W., Shimojima, N., Castanedes-Casey, M., Genco, P., Golde, T., Richelson, E., Dickson, D., McKinney, M. & Eckman, C.B., 2006. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J. Hepatol*, 44(6):1105-1114.
- Nicolao, F., Efrati, C., Masini, A., Merli, M., Attili, A.F. & Riggio, O., 2003. Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *J Hepatol*, 38(4):441-446.
- Niedermeyer, E. & Silva, L., 2005. *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. & Tsukita, S., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol*, 161(3):653-660.
- Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E. & Iadecola, C., 1997. Cyclo-Oxygenase-2 Gene Expression in Neurons Contributes to Ischemic Brain Damage. *J Neurosci*, 17(8):2746 - 2755.
- Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R. & Rama Rao, K.V., 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metab Brain Dis*, 19(3/4):313-329.
- Norenberg, M.D., Rao, K.V.R. & Jayakumar, A.R., 2005. Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Metab Brain Dis*, 20(4):303-318.
- Nystrom, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24(7):1311-1317.
- O'Donnell, M.E., Tran, L., Lam, T.I., Liu, X.B. & Anderson, S.E., 2004a. Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24(9):1046-1056.

O'Donnell, M.E., Lam, T.I., Tran, L. & Anderson, S.E., 2004b. The role of the blood-brain barrier Na-K-2Cl cotransporter in stroke. *Adv. Exp. Med. Biol*, 559:67-75.

Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. & Oliven, A., 2004. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int*, 24(2):110-116.

Odeh, M., Sabo, E., Srugo, I. & Oliven, A., 2005. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann. Med*, 37(8):603-612.

Oettl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallström, S., Lackner, C. & Stauber, R.E., 2008. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(7-8):469-473.

Olde Damink, S.W.M., Jalan, R., Deutz, N.E.P., Redhead, D.N., Dejong, C.H.C., Hynd, P., Jalan, R.A., Hayes, P.C. & Soeters, P.B., 2003. The kidney plays a major role in the hyperammonemia seen after simulated or actual GI bleeding in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 37(6):1277-1285.

Ong, J.P., Aggarwal, A., Krieger, D., Easley, K.A., Karafa, M.T., Van Lente, F., Arroliga, A.C. & Mullen, K.D., 2003. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am. J. Med*, 114(3):188-193.

Orellana, M., Rodrigo, R., Thielemann, L. & Guajardo, V., 2000. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 126(2):105-111.

Paemeleire, K., 2002. The cellular basis of neurovascular metabolic coupling. *Acta Neurol Belg*, 102(4):153-157.

Pockros, P., Hassanein, T., Vierling, J., Heuman, D., Hillebrand, D. & Chojkier, M., 2009. Phase 2, Multicenter, Randomized Study of AST-120 (spherical Carbon Adsorbent) Vs. Lactulose in the Treatment of Low-Grade Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol.*, 50:105.

Poon, H.F., Calabrese, V., Scapagnini, G. & Butterfield, D.A., 2004. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*, 59(5):478-493.

Poveda, M.-J., Bernabeu, A., Concepción, L., Roa, E., de Madaria, E., Zapater, P., Pérez-Mateo, M. & Jover, R., 2010. Brain edema dynamics in patients with overt hepatic encephalopathy A magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*, 52(2):481-487.

- Prasad, S., Dhiman, R.K., Duseja, A., Chawla, Y.K., Sharma, A. & Agarwal, R., 2007. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*, 45(3):549-559.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K. & Antel, J.P., 2001. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*, 36(2):145-155.
- Randolph, C., Hilsabeck, R., Kato, A., Kharbanda, P., Li, Y.-Y., Mapelli, D., Ravdin, L.D., Romero-Gomez, M., Stracciari, A. & Weissenborn, K., 2009. Neuropsychological assessment of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int*, 29(5):629-635.
- Ranganathan, R. & Ross, E.M., 1997. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr. Biol*, 7(12):R770-773.
- Rao, R.K., Basuroy, S., Rao, V.U., Karnaky Jr, K.J. & Gupta, A., 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J*, 368(Pt 2):471-481.
- Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S.M.A., Leyen, T., Lakeman, K., van Het Hof, B., Vivien, D. & de Vries, H.E., 2010. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J. Neurochem*, 113(2):447-453.
- Riordan, S.M. & Williams, R., 1997. Treatment of hepatic encephalopathy. *N. Engl. J. Med*, 337(7):473-479.
- Riordan, S.M. & Williams, R., 2010. Gut flora and hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med*, 362(12):1140-1142.
- Riordan, S.M. & Williams, R., 2000. Acute liver failure: Targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *J of Hepatol*, 32(Supplement 1):63-76.
- Rodrigo, R., Jover, R., Candela, A., Compañ, A., Sáez-Valero, J., Erceg, S. & Felipo, V., 2005. Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience*, 130(2):435-443.
- Romero, I.A., Radewicz, K., Jubin, E., Michel, C.C., Greenwood, J., Couraud, P.-O. & Adamson, P., 2003. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett*, 344(2):112-116.

Rose, C., Butterworth, R.F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., Spahr, L., Huet, P.-M. & Pomier-Layrargues, G., 1999a. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology*, 117(3):640-644.

Rose, C., Kresse, W. & Kettenmann, H., 2005. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J. Biol. Chem*, 280(22):20937-20944.

Rose, C., Michalak, A., Rao, K.V., Quack, G., Kircheis, G. & Butterworth, R.F., 1999b. L-Ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology*, 30(3):636-640.

Rosell, A. & Lo, E.H., 2008. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(1):82-89.

Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y. & Dencoff, J.E., 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 29(10):2189-2195.

Rovira, A., Alonso, J. & Córdoba, J., 2008. MR imaging findings in hepatic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol*, 29(9):1612-1621.

Rovira, A., Grivé, E., Pedraza, S., Rovira, A. & Alonso, J., 2001. Magnetization transfer ratio values and proton MR spectroscopy of normal-appearing cerebral white matter in patients with liver cirrhosis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22(6):1137-1142.

Rovira, A., Mínguez, B., Aymerich, F.X., Jacas, C., Huerga, E., Córdoba, J. & Alonso, J., 2007. Decreased white matter lesion volume and improved cognitive function after liver transplantation. *Hepatology*, 46(5):1485-1490.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S., 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell*, 11(12):4131-4142.

Sandoval, K.E. & Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis*, 32(2):200-219.

Schomberg, S.L., Su, G., Haworth, R.A. & Sun, D., 2001. Stimulation of Na-K-2Cl cotransporter in neurons by activation of Non-NMDA ionotropic receptor and group-I mGluRs. *J. Neurophysiol*, 85(6):2563-2575.

Schuppan, D. & Afdhal, N.H., 2008. Liver cirrhosis. *Lancet*, 371(9615):838-851.

Sedlakova, R., Shivers, R.R. & Del Maestro, R.F., 1999. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*, 31(1):149-161.

Seyan, A.S., Hughes, R.D. & Shawcross, D.L., 2010. Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress. *World J. Gastroenterol*, 16(27):3347-3357.

Sharma, P., 2009. Minimal hepatic encephalopathy. *J Assoc Physicians India*, 57:760-3.

Shawcross, D. & Jalan, R., 2005. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci*, 62(19-20):2295-2304.

Shawcross, D.L., Shabbir, S.S., Taylor, N.J. & Hughes, R.D., 2010. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*, 51(3):1062-1069.

Shigemori, Y., Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T. & Kawamata, T., 2006. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir. Suppl*, 96:130-133.

Shimajima, N., Eckman, C.B., McKinney, M., Sevlever, D., Yamamoto, S., Lin, W., Dickson, D.W. & Nguyen, J.H., 2008. Altered Expression of Zonula Occludens-2 Precedes Increased Blood-Brain Barrier Permeability in a Murine Model of Fulminant Hepatic Failure. *J Invest Surg*, 21(3):101-108.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A.B. & Aschner, M., 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*, 39(1):115-123.

Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K. & Kato, T., 1999. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience Research*, 35(2):155-164.

Steib, C.J., Bilzer, M., op den Winkel, M., Pfeiler, S., Hartmann, A.C., Hennenberg, M., Göke, B. & Gerbes, A.L., 2010a. Treatment with the leukotriene inhibitor montelukast for 10 days attenuates portal hypertension in rat liver cirrhosis. *Hepatology*, 51(6):2086-2096.

Steib, C.J., Hennenberg, M., Beitingger, F., Hartmann, A.C., Bystron, M., De Toni, E.N. & Gerbes, A.L., 2010b. Amiloride reduces portal hypertension in rat liver cirrhosis. *Gut*, 59(6):827-836.

Stewart, C.A., Malinchoc, M., Kim, W.R. & Kamath, P.S., 2007. Hepatic encephalopathy as a predictor of survival in patients with end-stage liver disease. *Liver Transpl*, 13(10):1366-1371.

- Sugimoto, R., Iwasa, M., Maeda, M., Urawa, N., Tanaka, H., Fujita, N., Kobayashi, Y., Takeda, K., Kaito, M. & Takei, Y., 2008. Value of the apparent diffusion coefficient for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Am. J. Gastroenterol*, 103(6):1413-1420.
- Sun, D. & Murali, S.G., 1998. Stimulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in neuronal cells by excitatory neurotransmitter glutamate. *Am. J. Physiol*, 275(3 Pt 1):C772-779.
- Sun, M.-C., Honey, C.R., Berk, C., Wong, N.L.M. & Tsui, J.K.C., 2003. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. *J. Neurosurg*, 98(3):565-569.
- Suzuki, Y.J., Carini, M. & Butterfield, D.A., 2010. Protein carbonylation. *Antioxid. Redox Signal*, 12(3):323-325.
- Swain, M., Butterworth, R.F. & Blei, A.T., 1992. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology*, 15(3):449-453.
- Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A. & Papadopoulos, M.C., 2008. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci*, 31(1):37-43.
- Tansey, F.A., Farooq, M. & Cammer, W., 1991. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J. Neurochem*, 56(1):266-272.
- Tarantino, G., Citro, V., Esposito, P., Giaquinto, S., de Leone, A., Milan, G., Tripodi, F.S., Cirillo, M. & Lobello, R., 2009. Blood ammonia levels in liver cirrhosis: a clue for the presence of portosystemic collateral veins. *BMC Gastroenterol*, 9:21.
- von Tell, D., Armulik, A. & Betsholtz, C., 2006. Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res*, 312(5):623-629.
- Tofteng, F., Hauerberg, J., Hansen, B.A., Pedersen, C.B., Jorgensen, L. & Larsen, F.S., 2005. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(1):21-27.
- Tong, X.K. & Hamel, E., 1999. Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(1):163-175.
- Traber, P.G., Canto, M.D., Ganger, D.R. & Blei, A.T., 1987. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: Ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology*, 7(6):1272-1277.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. & Tsukita, S., 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 126(4):741-754.

Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. & Tsukita, S., 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem*, 279(43):44785-44794.

del Valle, J., Camins, A., Pallàs, M., Vilaplana, J. & Pelegrí, C., 2008. A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue-Hoechst cocktail. *Journal of Neuroscience Methods*, 174(1):42-49.

Varsila, E., Pesonen, E. & Andersson, S., 1995. Early protein oxidation in the neonatal lung is related to development of chronic lung disease. *Acta Paediatrica*, 84(11):1296-1299.

Vigne, P., Lopez Farre, A. & Frelin, C., 1994. Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter of brain capillary endothelial cells. Properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions, calyculin A, and interleukin-1. *J. Biol. Chem*, 269(31):19925-19930.

Visse, R. & Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res*, 92(8):827-839.

Vitari, A.C., Thastrup, J., Rafiqi, F.H., Deak, M., Morrice, N.A., Karlsson, H.K.R. & Alessi, D.R., 2006. Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem. J*, 397(1):223-231.

Weiner, I.D. & Verlander, J.W., 2011. Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 300(1):F11-23.

Weissenborn, K., Ennen, J.C., Schomerus, H., Rückert, N. & Hecker, H., 2001. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J. Hepatol*, 34(5):768-773.

Weissenborn, K., Bokemeyer, M., Ahl, B., Fischer-Wasels, D., Giewekemeyer, K., van den Hoff, J., Köstler, H. & Berding, G., 2004. Functional imaging of the brain in patients with liver cirrhosis. *Metab Brain Dis*, 19(3-4):269-280.

Weissenborn, K., Heidenreich, S., Giewekemeyer, K., Rückert, N. & Hecker, H., 2003. Memory function in early hepatic encephalopathy. *J. Hepatol*, 39(3):320-325.

Widmaier, E., Raff, H. & Strang, K.T., 2006. *Vander's Human Physiology* 10^e éd., Mcgraw-Hill.

Wolburg, H. & Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol*, 38(6):323-337.

Wright, G. & Jalan, R., 2007a. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Best Pract Res Cl Ga*, 21(1):95-110.

Wright, G., Davies, N.A., Shawcross, D.L., Hodges, S.J., Zwingmann, C., Brooks, H.F., Mani, A.R., Harry, D., Stadlbauer, V., Zou, Z., Zou, Z., Williams, R., Davies, C., Moore, K.P. & Jalan, R., 2007b. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology*, 45(6):1517-1526.

Wright, G., Soper, R., Brooks, H.F., Stadlbauer, V., Vairappan, B., Davies, N.A., Andreola, F., Hodges, S., Moss, R.F., Davies, D.C. & Jalan, R., 2010. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J. Hepatol*, 53(1):91-97.

Yamamoto, S. & Nguyen, J.H., 2006. TIMP-1/MMP-9 imbalance in brain edema in rats with fulminant hepatic failure. *J. Surg. Res*, 134(2):307-314.

Yamamoto, Y., Yamashita, S., Fujisawa, A., Kokura, S. & Yoshikawa, T., 1998. Oxidative stress in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma evaluated by plasma antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 247(1):166-170.

Yan, Y., Dempsey, R.J. & Sun, D., 2001. Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 21(6):711-721.

Yan, Y., Dempsey, R.J., Flemmer, A., Forbush, B. & Sun, D., 2003. Inhibition of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage. *Brain Res*, 961(1):22-31.

Yang, T., Roder, K.E., Bhat, G.J., Thekkumkara, T.J. & Abbruscato, T.J., 2006. Protein kinase C family members as a target for regulation of blood-brain barrier Na,K,2Cl⁻ cotransporter during in vitro stroke conditions and nicotine exposure. *Pharm. Res*, 23(2):291-302.

Yang, X., Bosoi, C.R., Jiang, W., Tremblay, M. & Rose, C.F., 2010. Portacaval anastomosis-induced hyperammonemia does not lead to oxidative stress. *Metab Brain Dis*, 25(1):11-15.

Ytrebø, L.M., Kristiansen, R.G., Mæhre, H., Fuskevåg, O.M., Kalstad, T., Revhaug, A., Cobos, M.J., Jalan, R. & Rose, C.F., 2009. L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure. *Hepatology*, 50(1):165-174.

Zagórska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A.C., Rafiqi, F.H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R. & Alessi, D.R., 2007. Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *J. Cell Biol*, 176(1):89-100.

Ziylan, Y.Z., Uzüm, G., Bernard, G., Diler, A.S. & Bourre, J.M., 1993. Changes in the permeability of the blood-brain barrier in acute hyperammonemia. Effect of dexamethasone. *Mol. Chem. Neuropathol*, 20(3):203-218.

Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2):178-201.

