

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Implication des gènes de la famille Bcl-2 dans l'apoptose
des hépatocytes chez le rat Long-Evans Cinnamon

Par
Alexis-Simon Cloutier, M.D.

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de maîtrise ès sciences en Sciences Biomédicales

juin 2007

©Alexis-Simon Cloutier, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Implication des gènes de la famille Bcl-2 dans l'apoptose
des hépatocytes chez le rat Long-Evans Cinnamon**

Présenté par :
Alexis-Simon Cloutier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Marie-Josée Hébert
Présidente-rapporteur

Dr Jean-Cristophe Fournet
Membre du jury

Dr Michel Lallier
Directeur de recherche

Dr Steven R Martin
Co-directeur de recherche

Résumé

Introduction : La maladie de Wilson est une pathologie autosomale récessive causée par une mutation du gène ATP7B. Le rat LEC est un modèle de la maladie de Wilson qui développe une hépatite fulminante à l'âge de quatre mois environ. L'accumulation de cuivre dans le foie de ces rats stimule la production d'espèces réactives d'oxygène causant des stress oxydants. Le mécanisme entraînant la mort des hépatocytes nécessite une caractérisation supplémentaire.

But : Cette étude vise à étudier l'impact du cuivre alimentaire sur l'apoptose et sur l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au sein des hépatocytes chez le rat LEC.

Méthode : Quatre groupes de rat LEC ont été nourris avec des diètes aux différentes concentrations en cuivre et en fer. Le foie a été prélevé et les concentrations de cuivre et de fer hépatiques ont été mesurées. L'apoptose a été évaluée par coloration histologique de type TUNEL alors que l'expression des gènes de la famille Bcl-2 a été quantifiée par RT-PCR.

Résultats : Les rats nourris avec une diète enrichie en cuivre ont développé une hépatite fulminante. On a retrouvé significativement plus d'apoptose dans le foie de ces rats. Une corrélation directe a été observée entre la progression des concentrations hépatiques de cuivre et le degré de surexpression du gène Bad. Le gène Bcl-2 démontre la même tendance, mais avec une variation moins significative. Dans le groupe enrichi en cuivre, la surexpression de Bad et de Bcl-2 favorise le versant pro-apoptotique de l'équilibre. L'expression de Bak et de Bax n'ont pas paru modulées par l'accumulation hépatique de cuivre ou de fer.

Conclusion : L'apoptose est impliquée dans la pathogénèse de l'hépatite fulminante chez le rat LEC. Le déséquilibre de nature pro-apoptotique instauré entre les gènes Bad et Bcl-2 suggère fortement leur implication dans l'apoptose des hépatocytes.

Mots clés : Apoptose, Bcl-2, Bad, hépatocytes, maladie de Wilson, rat LEC, fer, cuivre

Abstract

Introduction : Wilson's disease (WD) is an autosomal recessively inherited disorder caused by a mutation in the *ATP7B* gene. The LEC rat is an animal model of WD that suffers spontaneous hepatitis. Copper accumulation in the liver of these rats stimulates the production of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress. Yet, the respective involvement of copper and iron in this insult remains unclear, while the mechanism by which hepatocytes die remains only partly explained.

Goal : To prove that copper is the main ion responsible for apoptosis in LEC rat hepatocyte and evaluate Bcl-2 family gene expression which are possibly mediating this process.

Method : Four groups of male LEC rats were fed diets containing different concentrations of iron and copper. Hepatic iron and copper concentrations were measured. Apoptosis was evaluated on histological slides by TUNEL staining, while RT-PCR was performed to quantify the expression of Bcl-2 family genes.

Results : Rats receiving a copper-enhanced diet developed fulminant hepatitis and showed significantly more apoptotic cells. A direct correlation was observed between the concentration of liver copper and the rise in pro-apoptotic gene Bad expression. Expression of anti-apoptotic Bcl-2 followed the same expression trend as Bad, but with lower intensity. In the copper-enhanced diet group, the relative expression of Bad and Bcl-2 favored the pro-apoptotic gene. Bak and Bax gene expressions in the liver were not significantly influenced by accumulation of copper or iron.

Conclusions : Apoptosis is involved in the pathogenesis of fulminant hepatitis in the LEC rat. The pro-apoptotic profile of gene expression established between Bad and Bcl-2 gene strongly suggest the involvement of these proteins in the mechanism leading to hepatocyte apoptosis.

Key words : Apoptosis, Bcl-2, Bad, hepatocytes, LEC rat, Wilson's Disease, copper, **iron**

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE ACTUELLE	2
Ingestion, absorption, transport et excrétion	2
Sources et apports	2
Fonction physiologique	2
Absorption	3
Circulation sanguine	3
Transport cellulaire	3
Tamponnage	10
Excrétion	11
Maladie de Wilson	12
Historique	12
Épidémiologie	12
Physiopathologie	13
Céruloplasmine	13
Présentation clinique et phénotype	14
Diagnostic	16
Dépistage génétique	20
Traitement	20
Transplantation hépatique	22
Rat Long-Evans Cinnamon : modèle de la maladie de Wilson	24
Historique	24
Évolution clinique et similitudes avec la maladie de Wilson	25
Différences entre le rat LEC et la maladie de Wilson	26
Gène ATP7B	27
Contexte d'oxydation et effets sur l'ADN	27
Stress oxydant	27
Gestion cellulaire des ERO	29

Surproduction d'ERO	30
Apoptose	32
Introduction	32
Mécanismes	33
Caspases	34
Voie mitochondriale	36
Protéines de la famille Bcl-2	38
Propagation du signal apoptotique	41
Méthode d'étude de l'apoptose	44
Apoptose chez le rat LEC	45
HYPOTHÈSE	47
ARTICLE	50
DISCUSSION ET CONCLUSION	78
Caractérisation supplémentaire du phénomène	78
Application des nouvelles connaissances	81
Avenues thérapeutiques envisageables	83
Contributions de l'apoptose au modèle de transplantation d'hépatocytes	84
BIBLIOGRAPHIE	88

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 :	16
Manifestations cliniques de la maladie de Wilson	
TABLEAU 2 :	17
Caractéristiques diagnostiques de la maladie de Wilson	
TABLEAU 3 :	18
Analyses de routine pour le diagnostic de la maladie de Wilson	
TABLEAU 4 :	23
Classification de l'insuffisance hépatique selon l'index pronostique de Nazer et al.	

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	4
Transport intracellulaire du cuivre	
FIGURE 2 :	7
ATPase de type P : ATP7A et ATP7B	
FIGURE 3 :	14
Fonction ferroxidase de la céruloplasmine	
FIGURE 4 :	19
Algorithme diagnostique de la maladie de Wilson	
FIGURE 5 :	28
Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie	
FIGURE 6 :	31
Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	
FIGURE 7 :	37
Mécanisme d'apoptose selon le type cellulaire (type I ou type II)	
FIGURE 8 :	40
La famille des protéines Bcl-2	
FIGURE 9 :	43
Modification des interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la mitochondrie en situation d'apoptose	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BH	« Bcl-2 homology »
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathione
LE	Rat Long-Evans
LEA	Rat Long-Evans Agouti
LEC	Rat Long-Evans Cinnamon
PTP	Pore de transition de perméabilité
SOD	Super oxyde dismutase
tBid	Bid tronqué
TM	Tétrahiomolybdate
TNF/NGF	« Nerve growth factor »
TPM	Transition de perméabilité mitochondriale

Contrairement à Sol qui n'a jamais été instructionné,
j'ai eu la chance d'aller à l'adversité...

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mes directeurs et co-directeurs de recherche, les docteurs Michel Lallier et Steven R. Martin. Ils ont su me guider à travers le monde fascinant de la recherche scientifique et m'inculquer des valeurs qui sauront me guider dans ma carrière de médecin-chercheur. Merci également au docteur Fernando Alvarez. Son support et ses commentaires ont maintes fois fait progresser mes travaux et cheminer mon esprit scientifique.

Merci à mes collègues de laboratoire, Gabriel Marceau, Susana Vitozzi, Réginald Renous, Amin Fakhfakh, Chantal Piché, Myriam Troesch, Denise Herzog et Idriss Djilali-Saiah pour la joie de vivre qu'ils ont apporté au travail quotidien et pour le support dans les moments plus difficiles que vous fait parfois vivre la recherche. Un merci tout spécial à Pascal Lapierre et Kathy Béland sans qui ce travail n'aurait certainement pas été possible, et sans qui cette expérience n'aurait jamais été aussi agréable.

Merci à ma conjointe et complice (et maintenant future épouse) Cathie Guimond. Sa confiance, son amour et son enthousiasme sans cesse renouvelés ont su me transporter tout au cours de la rédaction de ce mémoire.

Merci également à mes deux parents, Jean et Hélène Cloutier. Merci pour tout. Grâce à vous, c'est bien plus que l'« adversité » qui m'a sourit...

Merci au centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine et au département de chirurgie de l'Université de Montréal pour le soutien financier ayant permis la réalisation de mon projet de recherche.

Merci finalement au Fonds de Recherche en Santé du Québec pour la bourse qui m'a été octroyée dans le cadre de ma formation en vue de l'obtention de mon diplôme conjoint MD-M.Sc.

Introduction

Le cuivre fait parti des oligoéléments nécessaires à la vie. Son grand potentiel oxydatif est à la fois un outil très efficace et une menace constante pour les cellules. Le maintien de la concentration corporelle idéale est le fruit de complexes mécanismes cellulaires assurant l'homéostasie de cet élément. Le foie représente le principal centre organique de gestion du cuivre dans le corps des mammifères. Certaines pathologies génétiques compromettent la chaîne de transport nécessaire au maintien de l'équilibre précaire. La maladie de Menkes entraîne un déficit en cuivre, alors que la maladie de Wilson conduit à une accumulation de cuivre. C'est dans cette deuxième condition que tout le potentiel nocif du cuivre se révèle. Les cellules hépatiques sont certainement les premières à subir les effets néfastes de cet élément à deux visages. Le présent mémoire de maîtrise propose d'abord un survol des mécanisme régulant le transport et l'homéostasie du cuivre. Une attention particulière sera accordée à la protéine ATP7B. Celle-ci représente la pierre angulaire de la maladie de Wilson et par conséquent, un élément important de ce travail de recherche. La maladie de Wilson sera ensuite explorée autant sous un angle clinique que physiopathologique. Seront ensuite exposés les mécanismes sous-tendant les effets oxydatifs nocifs du cuivre au niveau cellulaire. Des notions concernant l'apoptose compléteront le tour d'horizon des assises théoriques du travail de recherche présenté dans la seconde section. La troisième et dernière section exposera la portée du projet de recherche présenté et les avenues scientifiques à explorer par la suite.

Revue de la littérature actuelle

Ingestion, absorption, transport et excrétion du cuivre

Sources et apports

La grande majorité du cuivre alimentaire provient des aliments à haute teneur tels que les fruits de mer, les abats, les noix et les graines.[1] Les apports de cuivre quotidiens pour un adulte varient de 0,6 à 1,6 mg de cuivre par jour[2]. L'apport alimentaire quotidien recommandé est de 0,9 mg de cuivre par jour et le niveau supérieur quotidien tolérable a été fixé à 10 mg par jour.[2]

L'apport alimentaire constitue cependant une bien petite proportion par rapport à la quantité totale réabsorbée à partir de la salive, des sucs gastriques, de la bile et des sécrétions pancréatiques et duodénales (4-7,5 mg/jour).

Fonctions physiologiques

C'est sans doute à cause de la facilité à le convertir entre les états d'oxydation (Cu^{2+}) et de réduction (Cu^+) que l'utilisation du cuivre est aussi répandue chez les organismes vivants. Cette caractéristique en a fait un cofacteur catalytique idéal pour la synthèse de multiples métalloenzymes aux vastes fonctions organiques. Parmi celles-ci on retrouve entre autre, la cytochrome c oxydase, enzyme terminale dans la chaîne de transport des électrons; la lysyl oxydase, essentielle pour la liaison entre le collagène et l'élastine; la dopamine- β -hydroxylase, requise pour la synthèse des catécholamines; la Cu/Zn superoxyde dysmutase (SOD), impliquée dans la défense contre les phénomènes d'oxydation[3].

Absorption

Lors de la digestion du bolus alimentaire, les aliments sont dégradés et le cuivre est libéré. C'est principalement au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle que cet oligoélément est absorbé. L'absorption proprement dite se fait à la fois par des transporteurs indépendants de l'énergie dans des contextes de faible concentration de cuivre, et par diffusion dans des situations de forte concentration[4].

La quantité absorbée varie selon les apports quotidiens [5, 6]. Lorsque l'apport est de moins de 1 mg/jour, plus de 50% du cuivre est absorbé. En comparaison, lorsque les apports dépassent 5 mg/jour, moins de 20% du cuivre est absorbé.[5] Mais malgré ces modulations en réponse aux concentrations environnementales de cuivre au niveau de l'intestin, le mécanisme d'absorption du cuivre n'est pas saturable. Une accumulation massive de cuivre hépatique peut donc facilement être induite chez un individu comportant un défaut d'excrétion.

Circulation sanguine

Après son absorption intestinale, le cuivre voyage liée à des protéines. Malgré l'abondance de l'albumine dans le plasma, seulement 10-12% du cuivre est lié à cette protéine. Chez l'humain et le rat, deux autres protéines impliquées dans le transport sérique du cuivre ont été identifiées : la céruloplasmine et la transcupréine[7, 8]. Dans des conditions normales, la céruloplasmine est probablement la source principale de cuivre pour les tissus. Quatre-vingt quinze pour cent du cuivre sérique est lié à cette protéine[9]:

Transport cellulaire

Tout être vivant, quel qu'il soit, présente des besoins en cuivre pour survivre. Au cours de l'évolution, divers mécanismes ont été développés par les eucaryotes pour répondre à ces besoins. *Saccharomyces cerevisiae* est une levure ayant servi à la caractérisation du

transport cellulaire du cuivre chez les eucaryotes de plus basse échelle. Chez cette levure, la régulation du cuivre est assurée par des facteurs de transcription cupro-sensibles qui modulent l'expression de multiples gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme du cuivre.[10, 11] Contrairement à *S. cerevisiae*, il semble que l'homéostasie du cuivre au sein des cellules de mammifères soit principalement maintenue par un contrôle de l'activité des protéines de transport via un mécanisme post-transcriptionnel.[12] La figure 1 résume les fonctions des diverses protéines impliquées dans le transport du cuivre dans les cellules mammifères.

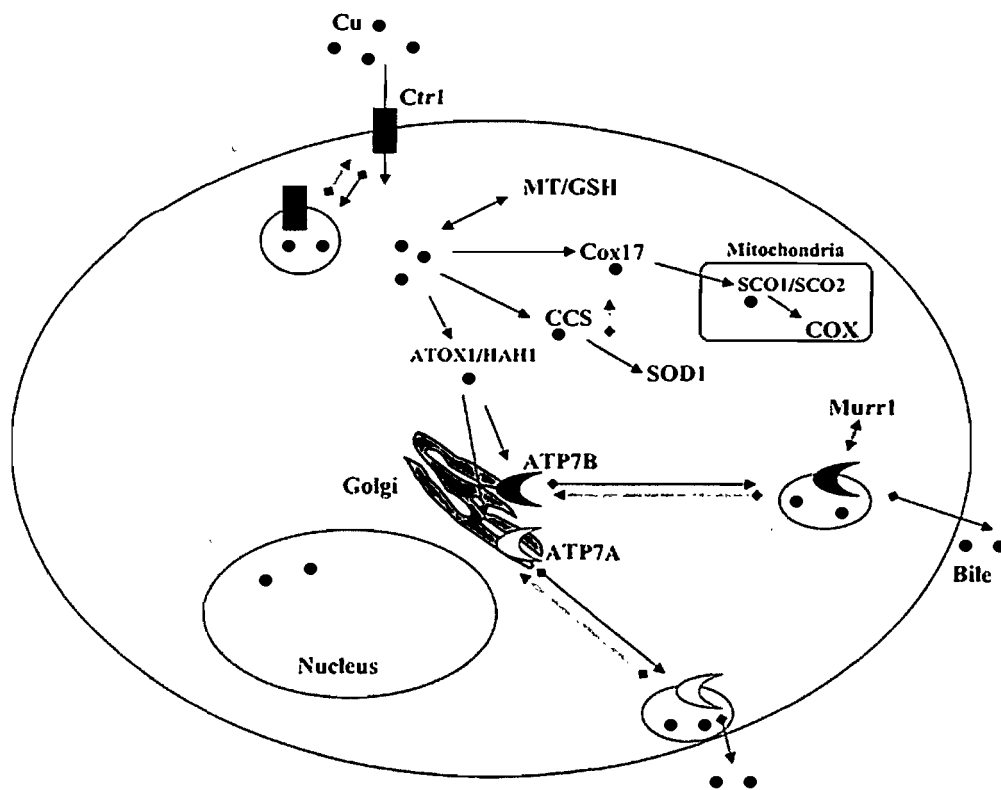


FIGURE 1 : Transport intracellulaire du cuivre

L'ensemble des protéines impliquées dans le transport intracellulaire sont représentées. Exceptionnellement, les ATPases de type P (ATP7A et ATP7B) sont représentées au sein de la même cellule sur cette figure. Elles sont normalement retrouvées au sein de tissus différents (Tiré et modifié de : Bertinato et L'Abbé, Nutr Biochem 2004)[13]

hCtr1

La première étape du transport cellulaire du cuivre est certainement son incorporation dans le cytosol. La principale protéine de transport est hCtr1. Cette protéine est fortement préservée au cours de l'évolution, comme en témoigne la présence d'une protéine orthologue chez *S. cerevisiae*. Zhou et al. ont isolé cette protéine à grande affinité pour le cuivre[14]. L'ARNm de hCtr1 est traduit de manière ubiquitaire. On le retrouve à de plus fortes concentrations au niveau du foie, du cœur et du pancréas, et à des concentrations moindres au niveau du cerveau, des muscles et de la rate.[14] Le modèle de souris hétérozygotes Ctr1^{+/-} a permis de démontrer que cette protéine est grandement impliquée dans l'incorporation cellulaire du cuivre au niveau de la rate et du cerveau. Cependant, ces mêmes souris hétérozygotes ne présentent aucune différence de concentration de cuivre au niveau du foie par rapport aux souris Ctr1^{+/+}. Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme d'incorporation du cuivre indépendant de Ctr1 au niveau hépatique[15]. Cette hypothèse est d'ailleurs largement supportée par le fait que des cellules Ctr1^{-/-} accumulent du cuivre malgré leur déficit [16].

En plus de sa contribution majeure dans le transport du cuivre, hCtr1 semble jouer un rôle dans la régulation de ce même transport. La localisation cellulaire de hCtr1 est modulée par la concentration intracellulaire de cuivre. On la retrouve intégrée à la membrane cellulaire lorsque la concentration cellulaire de cuivre est faible, alors qu'elle est rapidement internalisée au sein de vésicules cytoplasmiques lorsque les niveaux de cuivres sont élevés. La variation de la localisation de hCtr1 permettrait donc une gestion de l'afflux de cuivre vers le compartiment intracellulaire.[17]

Protéines chaperon

Un groupe de protéines appelées protéines chaperon est responsable de la distribution intracellulaire du cuivre. ATOX1 est membre de cette famille. La majorité du cuivre absorbé dans une cellule est transporté par ATOX1 vers le réseau trans-golgi. Les ions y sont pris en charge par des ATPases de type P. Dans un entérocyte, cette ATPase sera certainement la protéine ATP7A, alors qu'au niveau des hépatocytes ATP7B recevra

l'ion de cuivre. Hamza et al.[18] ont démontré à la fois cette interaction directe entre ces deux ATPases de type P et ATOX1, et une circulation inefficace du cuivre au niveau intracellulaire en l'absence de ATOX1.

La protéine CCS est une autre protéine chaperon découverte via son interaction avec l'enzyme antioxydante Cu/Zn superoxyde dysmutase (Cu/Zn-SOD) au niveau du cytoplasme [19, 20]. CCS est la protéine fournissant le cuivre à Cu/Zn-SOD. CCS jouerait un rôle de priorisation dans la distribution du cuivre lorsque les réserves sont limitées.

Murr1 est une autre protéine impliquée dans le transport du cuivre, mais dont le rôle exact n'est pas encore défini. Murr1 est le gène muté chez les terriers Bedlington. Ces chiens développent une toxicose hépatique au cuivre[21]. De récentes études portent à croire que cette protéine jouerait un rôle dans le mouvement du cuivre vers les vésicules et dans son excrétion au niveau canaliculaire de la membrane hépatocytaire[21]. Une interaction entre Murr1 et ATP7B, a récemment été démontrée.[22]

ATPases de type P

C'est au travers de l'étude des pathologies atteignant l'homéostasie du cuivre qu'ont progressé bon nombre de connaissances concernant les mécanismes de transport du cuivre au niveau systémique. Les maladies de Menkes et de Wilson sont toutes deux des pathologies impliquant une mutation au niveau d'un gène codant pour une ATPase de type P, soient ATP7A et ATP7B, respectivement. Ces deux protéines jouent un rôle prépondérant dans la cupro-régulation. Les deux ATPases jouent un rôle similaire au niveau cellulaire, contrairement à ce que pourrait nous laisser croire les phénotypes différents de ces deux maladies. Ce fait est d'ailleurs supporté par les études de La Fontaine et al. et Payne et Gitlin[23, 24]. Ces deux groupes ont restauré la fonction déficiente au sein de fibroblastes atteints de la maladie de Menkes en y exprimant la protéine recombinante de la maladie de Wilson.

Ces deux protéines appartiennent à la famille ATPase de type P. Les ATPases sont des transporteurs de cations. Elles puisent leur énergie de l'hydrolyse de l'ATP en réalisant

un transfert du γ -phosphate de l'ATP vers le résidu Asp du motif DKTG (Figure 2)[3]. Cette énergie acquise permet de transloquer un cation métallique au travers d'une double membrane lipidique qui forme un compartiment cellulaire. La famille des ATPases de type P comporte plus de 200 membres. Des représentants de cette famille ont été retrouvés dans tous les organismes, incluant les bactéries, les levures, les plantes et les mammifères[25].

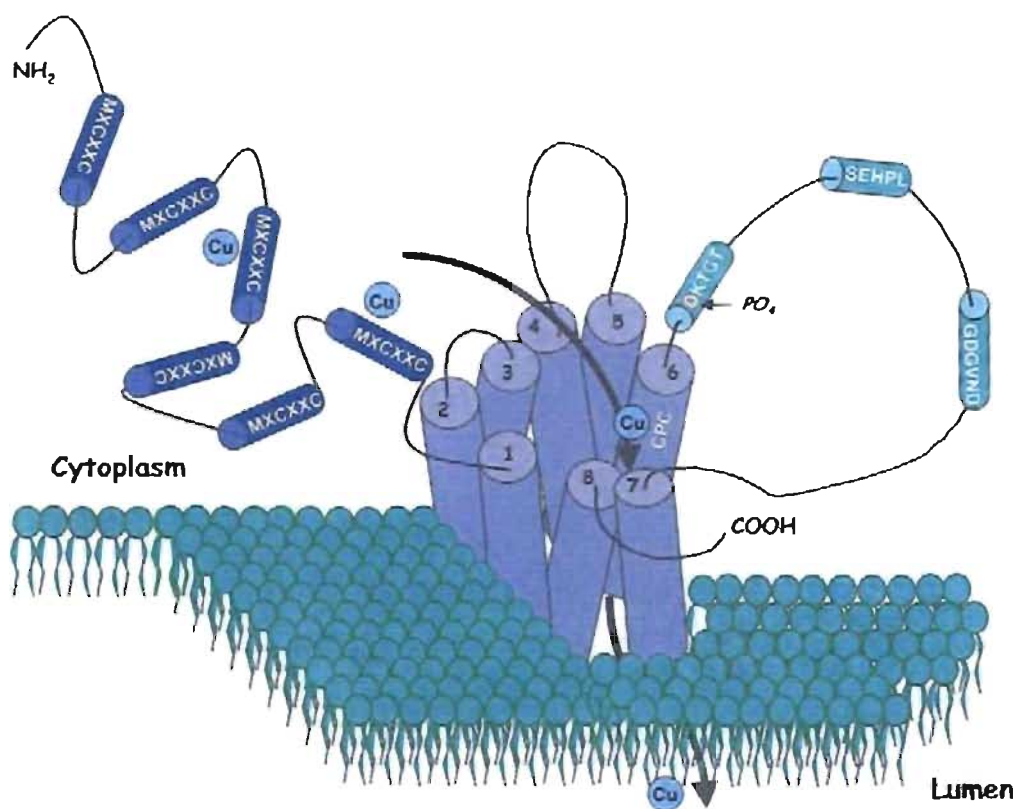


FIGURE 2 : ATPase de type P : ATP7A et ATP7B

(Tirée et modifiée de Payne et Gulin J Biol Chem 1998)[23]

ATP7A

La protéine de Menkes, ATP7A, est une protéine ubiquitaire qui régule l'absorption du cuivre dans le tractus gastro-intestinal. Au niveau intracellulaire, l'ATP7A occupe une double fonction : la livraison du cuivre aux cupro-enzymes dans l'appareil de Golgi et l'excrétion de l'excédent de cuivre. Sa principale différence avec son homologue ATP7B réside dans la nature des tissus l'exprimant. En effet, l'ATP7A se retrouve dans la plupart des organes, à l'exception du foie, où l'ATP7B remplit les tâches déléguées aux ATPases de type P. Hormis cette différence, les deux protéines sont d'une grande similitude. Les particularités moléculaires et conformationnelles des deux ATPases seront donc élaborées davantage dans la section consacrée à l'ATP7B.

ATP7B

Le gène *ATP7B* associé à la maladie de Wilson est localisé au niveau du locus q14.3 du chromosome 13[26]. Ce gène mesure 80kb et contient 22 exons permettant la transcription d'un brin d'ARNm de 7,5-kb[27]. Cet ARNm permet la traduction d'une protéine de grande taille contenant 1465 acides aminés.

Cette protéine oeuvrant dans le transport des cations comporte un domaine impliqué dans la transduction de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP, un canal à cations, un domaine de phosphorylation, un domaine de liaison à l'ATP et huit régions hydrophobes traversant présumément la membrane cellulaire (Figure 2)[28-30]. L'ATP7B comporte également six sites de liaison au cuivre dans sa portion N-terminale. Ces sites sont d'une longueur d'environ 70 acides aminés. Ces sites de liaison sont traduits avec le motif suivant : MXCXXC (M = méthionine; C = cystéine; X = tout autre acide aminé). Le cuivre y est lié sous sa forme réduite (Cu^+). Les deux cystéines du motif MXCXXC coordonnent le lien avec le cuivre[31]. D'ailleurs, des études d'absorption de rayons-X suggèrent fortement que les atomes Cu^+ sont liés aux composantes cystéine de la protéine. Des analyses spectrales dichromatiques suggèrent de plus que la liaison du cuivre à son domaine entraîne des changements de conformation secondaires et tertiaires de l'ATP7B[32].

Au-delà des motifs MXCXXC, l'ATP7B possède plusieurs autres motifs caractéristiques de la famille des ATPases de type P. On retrouve les motifs TGES/A, DKTG et TGDN sur deux boucles cytosoliques de la protéine. Ces « signatures » ont été démontrées indispensables pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP chez de nombreux membres des ATPases de type P. Des changements conformationnels accompagnent d'ailleurs ces processus. L'ATPase d'intérêt présente également des caractéristiques structurales spécifiques directement reliées à sa fonction de transporteur de cuivre. Le motif CPC, entre autres, est fréquemment retrouvé au sein des ATPases de type P transportant des métaux de transition (la sous-famille de type P₁).

L'ATP7B est fortement transcrite dans le foie et au niveau des reins, du cerveau, du placenta et du coeur à de plus faibles concentrations[27, 33-39]. C'est principalement au niveau hépatique qu'elle détecte le niveau de cuivre intracellulaire[28], une forme de « cupro-thermostat ». Les variations dans la concentration du cuivre exercent une influence sur les changement de conformations protéiques.

Lorsque les concentrations cellulaires sont relativement peu élevées, le cuivre est principalement utilisé à la synthèse de protéines. L'ATP7B se retrouve donc principalement au niveau du réseau trans-Golgi.[33, 40]. Par contre, un excès de cuivre cellulaire favorise un changement de conformation de l'ATP7B, entraînant le mouvement de celle-ci vers des vésicules cytoplasmiques concentrés près des canalicules hépatocytaires[40, 41]. Ce déplacement de l'ATP7B lui permet d'exercer une fonction dans l'excrétion du cuivre au niveau de la bile.[28, 42] Le mécanisme exacte d'excrétion du cuivre contenu dans les vésicules reste à clarifier. Roelofsen *et al.* ont avancé l'hypothèse selon laquelle l'ATP7B pourrait assurer un transit du cuivre à la membrane cellulaire pour y expulser le cuivre[41]. D'autres auteurs sont davantage d'avis que le cuivre contenu dans les vésicules est exocyté tandis que l'ATP7B retourne au niveau du réseau trans-Golgi[43-45]. La manière avec laquelle le cuivre est libéré demeure également une question à élucider. Un changement de conformation entraînerait potentiellement une diminution de l'affinité avec le cuivre et en stimulerait

le relâchement. On pourrait envisager également que des protéines servent de réceptacle extra-cellulaire.[3]

La localisation intra-vésiculaire témoigne également d'une fonction protectrice de la protéine face aux effets délétères d'un excès de cuivre dans la cellule. En séquestrant le cuivre au sein des vésicules, l'ATP7B empêche sa relâche nuisible au niveau cytoplasmique. La migration vésiculaire de la protéine est un phénomène réversible puisque l'ATP7B retourne au niveau du réseau trans-Golgi lorsque la concentration basale de cuivre est restaurée.

Selon de récentes études, la variation de la concentration de cuivre modulerait également les modifications post-transcriptionnelles de l'ATP7B. Une augmentation du cuivre dans l'environnement cellulaire entraînerait une stimulation 2 à 3 fois plus importante de sa phosphorylation kinase-dépendante. Cette modulation de la phosphorylation pourrait avoir un rôle sur la localisation cellulaire de l'ATP7B[3]. Dans les travaux de Vanderwerf et al.[46], un ajout de cuivre au médium cellulaire a déclenché l'augmentation du niveau de phosphorylation de l'ATP7B et une mobilisation de la protéine vers les compartiments vésiculaires. Inversement, un retour au médium de base entraîne une diminution de la phosphorylation de l'ATPase et son retour au niveau du réseau trans-Golgi.

Tamponnage

Il serait impensable de retrouver des ions de cuivre libres à l'intérieur d'une cellule vivante. Le cuivre libre est d'ailleurs virtuellement inexistant au sein des cellules. C'est qu'il possède une nature extrêmement réactive sous cette forme. Il peut engendrer des dommages aux membranes, aux protéines et à l'ADN. Le cuivre est donc placé sous haute surveillance. Sous des conditions normales, les cellules disposent donc de capacités de tamponnage surpassant largement les besoins[47].

Les métallothionéines sont un groupe de protéines cytosoliques de bas poids moléculaire riches en cystéine. Elles se retrouvent chez les vertébrés, mais également chez les invertébrés et les fungi[48]. Ces protéines semblent jouer un rôle important dans l'accumulation hépatique de cuivre. Le cuivre couplé aux méthallothionéines est stocké sous une forme sécuritaire pour la cellule. Ainsi bâillonné, le cuivre ne peut prendre part à la genèse de radicaux libres potentiellement dommageables. Le cuivre stocké dans les métallothionéines peut être redistribué à d'autres protéines, par l'entremise de la dégradation lysosomes ou via le complexe glutathione (GSH)[28]

La synthèse de méthallothionéines peut être induite par le cuivre, le zinc, le cadmium et d'autres oligoéléments via un processus impliquant une augmentation de la transcription génique[49]. Le cuivre est l'ion possédant la plus grande affinité avec les métallothionéines. Cette caractéristique lui permet de déplacer n'importe quel ion afin de se lier aux métallothionéines. Ce sont d'ailleurs ces deux principes qui sous-tendent le traitement de la maladie de Wilson, et de l'accumulation de cuivre qui la caractérise, par l'administration de zinc.

Le GSH joue un rôle s'apparentant à celui des métallothionéines. Présent dans de nombreux tissus, ce tripeptide a la capacité de lier le cuivre sous sa forme réduite (Cu^+). Il jouerait également un rôle dans l'excrétion biliaire du cuivre[50, 51].

Excrétion

Un adulte excrète environ 1 mg de cuivre quotidiennement. La bile constitue la principale voie d'excrétion du cuivre, les autres voies étant relativement négligeables. Au niveau de la bile, il existe plusieurs voies d'excrétion différentes. On retrouve la voie dépendant de GSH au niveau des membranes canaliculaires et la sécrétion directe via ATP7B[52]. C'est cependant l'exocytose à partir de vésicules cytoplasmiques qui serait la méthode de prédilection des hépatocytes pour excréter le cuivre selon Cater et al.[53] La protéine ATP7B semble d'ailleurs impliquée dans la séquestration du cuivre au sein des vésicules cytoplasmiques lorsque les niveaux intracellulaires de cuivre s'élèvent.

Maladie de Wilson

Historique

La maladie de Wilson n'est reconnue comme entité que depuis le début du XX^e siècle. C'est en 1912 qu'un neurologue britannique du nom de Samuel Alexander Kinnear Wilson a rapporté les cas de sept patients présentant une forme familiale d'une atteinte neurologique primaire associée à une cirrhose hépatique. Cette pathologie fut initialement appelée dégénérescence lenticulaire progressive[54]. Au cours de la même année, Fleischer décrivit l'association de symptômes neuro-psychiatriques, de cirrhose hépatique et de pigmentation cornéenne[55]. Cependant, ce n'est qu'en 1948 que Cumings a identifié l'élément responsable de la pathogénèse de la maladie de Wilson. Cumings a retrouvé de grandes quantités de cuivre dans le foie et le cerveau des patients atteints[56]. En 1960, Bearn[57] démontra la nature autosomale récessive de la maladie, et en 1985, Frydman et al.[26] ont établi le lien avec le chromosome 13q14.3. Finalement, c'est en 1993 que le gène de la maladie de Wilson a enfin été cloné. D'un même élan, on a démontré que ce gène était responsable de la transcription d'une ATPase de type P[27, 34].

Épidémiologie

La maladie de Wilson est une maladie autosomale récessive. L'incidence de cette atteinte est d'environ 1 cas pour 30 000 naissances[58]. La fréquence des porteurs est d'environ 1 pour 90[59].

Au-delà de 200 mutations du gène ATP7B ont été rapportées à ce jour. La mutation la plus commune de l'ATP7B est H1069Q. Cette mutation antisens est présente chez 40% des patients originaires de l'Europe du Nord, alors que c'est la mutation A778L qui est prédominante chez les patients asiatiques avec une prévalence de 30% des cas[60]. Par

contre, plus de la moitié des mutations répertoriées sont rarissimes peu importe la population étudiée et n'ont en fait été documentée que chez un patient unique[61]. Une banque de donnée contenant la totalité des mutations connues est maintenue à l'Université d'Alberta :

(<http://www.uofa-medical-genetics.org/wilson/index.php>)

et à la *Sackler School of Medicine* :

(<http://life2.tau.ac.il/GeneDis/Tables/Wilson/wilson.html>).

Physiopathologie

ATP7B

Plusieurs mutations causant la maladie de Wilson au niveau phénotypique impliquent des motifs caractéristiques de l'ATP7B ou des zones avoisinantes. Ces observations militent en faveur d'un rôle important de ces sections dans la fonction de la protéine.

La protéine ATP7B issue de la mutation H1069Q, la plus fréquente, présente des défauts de repliement. Elle est dégradée par les protéasomes du cytoplasme et dispose donc d'une demie-vie cinq fois plus courte que la protéine intacte. Ces anomalies de conformation et de dégradation illustrent une gamme plus large des mutations d'ATP7B impliquant diverses substitutions d'acides aminés. Les protéines résultantes sont anormalement repliées, non-fonctionnelles et donc rapidement dégradées[28].

Céruleplasmine

La céruleplasmine est une glycoprotéine plasmatique synthétisée par le foie et contenant de 90 à 95% du cuivre sérique. Elle reçoit les atomes de cuivre qui la composent directement de l'ATP7B. Le mécanisme d'insertion de ces ions à l'apo-céruleplasmine sont encore mal connus.

La céruloplasmine dispose d'un fort potentiel oxydatif important et principalement utilisé dans la chaîne de transport du fer. Comme le démontre la figure 3, la céruloplasmine oxyde le fer au niveau de l'hépatocyte afin de permettre sa liaison à la transferrine et son départ en circulation.[62]

Dans la maladie de Wilson, l'incapacité de l'ATP7B mutée à incorporer le cuivre adéquatement au sein de la céruloplasmine altère la structure de cette dernière. Cette modification structurelle rend la protéine moins stable en circulation et diminue donc le niveau sérique de céruloplasmine. Bien que cette diminution sérique ne soit pas pathognomonique, cette particularité phénotypique peut s'avérer utile pour des fins diagnostiques. Scheinberg et Gitlin ont été les premiers à rapporter cette utilité il y a plus d'un demi siècle[63].

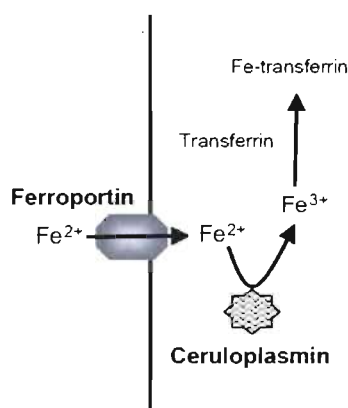


FIGURE 3 : Fonction ferroxidase de la céruloplasmine

Tiré de : Siah Clinica Chimica Acta 2005 [62]

Présentation clinique et phénotype

Bien que l'accumulation de cuivre puisse entraîner une dysfonction de divers tissus, et ainsi mener à une symptomatologie qui soit rattachée à cette atteinte, la très grande majorité des patients atteints de la maladie de Wilson consulteront pour une atteinte de la fonction hépatique ou du système nerveux central[64-66].

L'âge au diagnostic varie considérablement entre les patients, passant de 3 ans à 61 ans. Il semble malgré tout assez rare que la maladie se manifeste initialement après la quatrième décade[67, 68]. De manière générale, la symptomatologie initiale semble être reliée à l'âge de présentation du patient. Quatre-vingt pour cent des enfants se présentant au cours de la première décade sont diagnostiqués sur la foi d'une symptomatologie hépatique, alors que chez les patients au-delà de vingt ans, ce sont les troubles neuro-psychiatriques qui dominent au moment du diagnostic[69].

L'atteinte hépatique peut se manifester par un éventail de présentations allant d'une légère élévation des aminotransférases sériques chez le patient asymptomatique à l'hépatite ou chronique, à la cirrhose et les séquelles de l'hypertension portale qui y sont associées, ou encore à l'insuffisance hépatique fulminante. Les présentations aiguës s'accompagnent généralement d'une relâche sérique de cuivre entraînant une anémie hémolytique chez le patient atteint.

L'atteinte neurologique dominante est une anomalie du mouvement atteignant particulièrement les muscles bulbaires, un groupe de muscles contrôlés par le bulbe au niveau du tronc cérébral et responsables des muscles utilisés pour la déglutition ou la parole[68]. Également, on retrouve parfois une diminution de l'expression faciale et de la dystonie s'apparentant à la maladie de Parkinson, un tremor, des comportements anormaux, des changements de personnalité et des symptômes dépressifs[70]. Le tableau 1 résume les manifestations cliniques les plus susceptibles d'être rencontrées chez un patient atteint de la maladie de Wilson.

Dans certains cas, les patients atteints de la maladie de Wilson peuvent se présenter avec un cancer hépatocellulaire. Il est rare que le cancer soit la condition de présentation initiale d'un patient. Il est d'autant plus rare qu'un patient déjà diagnostiqué et traité développe un cancer de ce type. Cette faible prévalence est due à la persistance d'une activité résiduelle de la céruloplasmine permettant une mobilisation du fer hépatique, alors que son accumulation semblerait être impliquée dans le développement du carcinome hépatocellulaire[71]. De plus, il est fort probable que le traitement donné aux patients prévienne la carcinogénèse en modifiant l'évolution naturelle de la maladie.

TABLEAU 1 : Manifestations cliniques de la maladie de Wilson

SYSTÈMES	MANIFESTATIONS CLINIQUES
Hépatique	Hépatite chronique, cirrhose, insuffisance hépatique fulminante, cholélithiase, péritonite bactérienne spontanée
Neurologique	Atteinte extrapyramidale, atteinte cérébelleuse, signes pseudobulbaires
Psychiatrique	Psychose, anomalie du comportement
Hématologique	Anémie, hémolyse
Ophthalmologique	Anneaux de Kayser-Fleischer, cataracte en « tournesol »
Néphrologique	Dysfonction des tubules proximaux (aminoacidurie, hyperphosphaturie, hypercalciurie, glycosurie), dysfonction des tubules distaux, acidose, calculs rénaux (phosphate/urate de calcium)
Endocrinologique	Hypoparathyroïdie, hypercalciurie
Squelettique	Ostéoarthropathie, ostéochodrite disséquante

Tableau tiré de : Gitlin N, Journal of Hepatology, 1998 [72]

Diagnostic

Un survol de la littérature actuelle sur le diagnostic de la maladie de Wilson mène au constat qu'il n'existe malheureusement pas d'examen, de test ou de procédure disposant d'une spécificité et d'une sensibilité suffisante pour en faire l'épreuve diagnostic de choix. La variabilité de la pénétrance du gène muté et le phénotype parfois flagrant, parfois discret qui en découle rend la tâche diagnostique plus ou moins laborieuse selon les cas. Les tableaux 2 et 3 dressent respectivement les signes cliniques et les examens de laboratoire susceptibles de contribuer au diagnostic de la maladie de Wilson.

TABLEAU 2 : Caractéristiques diagnostiques de la maladie de Wilson**Caractéristiques fréquentes**

Asymptomatique avec légère élévation des transaminases
 Cirrhose hépatique progressive avec fatigue, anorexie, ictère
 Hépatite chronique active avec légère élévation des transaminases
 Insuffisance hépatique rapidement progressive avec hémolyse intravasculaire et splénomégalie
 Caractéristiques parkinsoniennes avec trémor, bradykinésie, rigidité et dysarthrie
 Changement de personnalité avec altération de l'humeur, faible performance scolaire et impulsivité
 Désordre affectif, schizophrénie, psychose
 Anneau de Kayser-Fleischer (visible à l'œil nu)^a
 Syndrome de Fanconi avec aminoacidurie et glycosurie
 Anémie hémolytique Coombs-négatif

Caractéristiques plus rares

Cardiomyopathie avec dysrythmie
 Ostéomalacie avec arthrite
 Aménorrhée et puberté tardive
 Hypothyroïdie et hypoparathyroïdie
 Cataracte « sunflower » et lunule azure

Caractéristiques paracliniques

Concentration sérique de céruloplasmine < 20 mg/dl
 Cuivre sérique < 100 µg/dl ^b
 Anneau de Kayser-Fleischer (visible avec la lampe à fente)
 Contenu hépatique en cuivre >250 µg/g de masse déshydratée ^{c,d}
 Contenu urinaire en cuivre >100 µg/24 h ^d
 Imagerie : altération des noyaux gris centraux, atrophie de la matière blanche sous-corticale
 Biopsie hépatique : infiltration graisseuse, dépôt de glycogène, cirrhose micro-nodulaire, infiltration lymphocytaire, hépatite active chronique avec nécrose, fibrose
 Analyse génétique : détection de mutations spécifiques dans le gène de l'ATP7B

^a Anneau de Kayser-Fleischer sont rarement visible sans lampe à fente

^b Cuivre libre ou non-lié à la céruloplasmine (0,05 µmol cuivre/ml céruloplasmine) est augmenté

^c Taille et échantillonnage sont importants à cause du risque d'erreur due à la distribution inégale du cuivre dans le foie.

^d Précautions doivent être prises pour éviter la contamination venant des aiguilles, de l'eau ou autres

Le diagnostic semble plus évident chez un patient dont la maladie se manifeste par une atteinte neurologique. Sternlieb avance même qu'aucun autre test diagnostique n'est requis si le patient démontre des symptômes neurologiques potentiellement suggestifs de la maladie de Wilson, et qu'il présente des anneaux de Kayser-Fleischer et/ou un niveau de céruloplasmine abaissé[74]. Le diagnostic est généralement basé sur l'association entre la symptomatologie clinique et les résultats des examens de laboratoire. (tableau 3). L'examen neurologique clinique semble être l'outil le plus sensible afin de déceler les anomalies de cette nature. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet par la suite de documenter l'étendue des changements au sein du système nerveux central[75].

TABLEAU 3 : Analyses de routine pour le diagnostic de la maladie de Wilson

Test	Résultats	Faux négatif	Faux positif
Céruloplasmine sérique	diminuée	Normal dans : Inflammation hépatique marquée surestimée par analyse immunologique	Diminué dans : Malabsorption Acéruoplasminémie Insuffisance hépatique Hétérozygotes
Collecte urinaire 24 h	> 100 µg/jour	Normal : Recueil incorrecte des urines Enfant sans atteinte hépatique	Augmenté : Nécrose hépatocellulaire Contamination
Cuivre libre sérique	> 10 µg/dL	Normal : Surestimation par analyse immunologique	
Cuivre hépatique	> 250 µg/masse déshydratée	Dû au variation régionale si maladie hépatique active ou nodule régénératif	Syndrome cholestatique
Anneau Kayser-Fleischer (lampe à fente)	Présent	Dans plus de 40% des patients avec maladie de Wilson et la plupart de la fratrie asymptomatique	Cirrhose biliaire primitive

Tiré de Ferenci P Aliment Pharmacol Ther 2004[76]

Le diagnostic est plus ardu à poser lorsque le clinicien est confronté à un patient dont la symptomatologie est essentiellement hépatique. Dans ces cas, une alliance entre les

symptômes cliniques et de nombreux tests est souvent nécessaire pour poser un diagnostic certain. Les anneaux de Kayser-Fleischer sont absents dans des proportions allant jusqu'à 50% de ces patients, et parfois même au-delà chez les patients à la présentation fulminante[77]. Un faible niveau de céruloplasmine sérique n'est pas non plus diagnostic. La malnutrition sévère, l'hépatite autoimmune et l'acéruplasminémie sont des exemples d'autres conditions pathologiques pouvant entraîner la baisse du niveau sérique de céruloplasmine.

Parmi les autres tests pouvant contribuer au diagnostic, on retrouve la concentration sérique de cuivre libre, l'excrétion urinaire de cuivre et la concentration hépatique de cuivre. Le tableau 3 expose les résultats auxquels on s'attendrait chez un patient atteint de la maladie de Wilson. Ce même tableau rapporte également certaines conditions susceptibles de donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

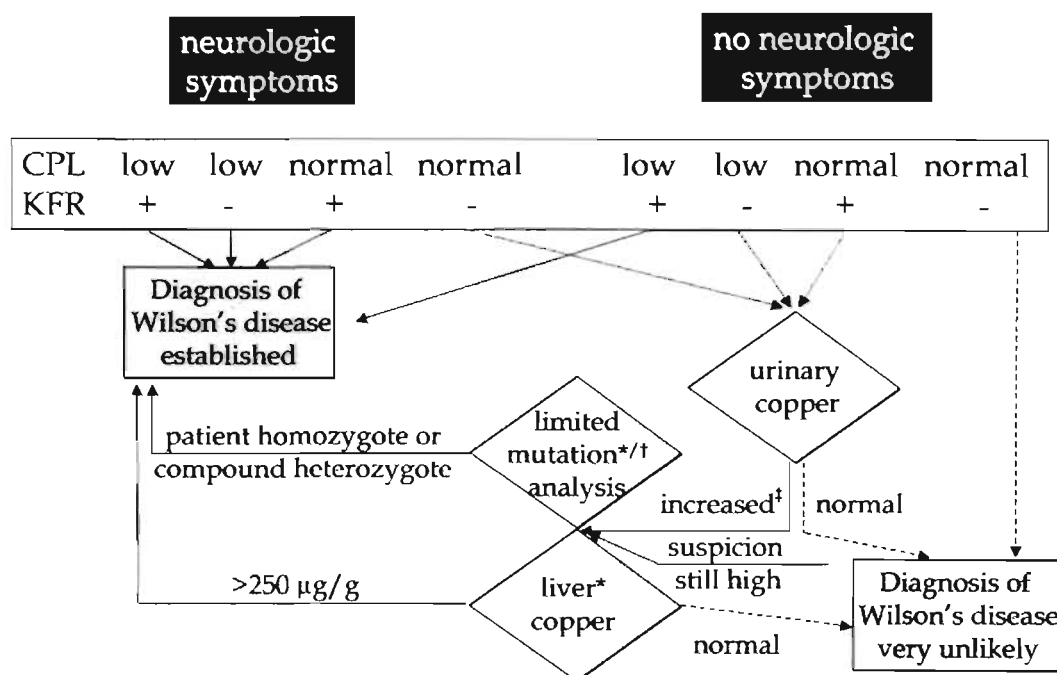


FIGURE 4 : Algorithme diagnostique de la maladie de Wilson

Tirée de Ferenci P Aliment Pharmacol Ther 2004[76]

La figure 4 représente l'algorithme diagnostique suggéré par Ferenci P.[76]. Il est intéressant de remarquer que les tests génétiques ne sont recommandés que dans des cas très restreints. L'analyse génétique dispose d'un impact limité pour deux raisons. Premièrement, les mutations causant la maladie de Wilson sont multiples, mais chacune d'elle n'est responsable que d'une faible proportion des cas. Deuxièmement, la majorité des patients sont des hétérozygotes combinés, c'est-à-dire qu'ils présentent deux mutations différentes. En fait, l'analyse génétique s'avère utile uniquement chez les patients originaires d'une région géographique où une mutation est largement dominante (exemple H1069Q en Europe du Nord).

La biopsie hépatique ne représente pas un outil diagnostique des plus puissants. Les trouvailles histologiques sont non-spécifiques par rapport à plusieurs autres atteintes hépatiques. L'analyse microscopique peut s'avérer utile afin d'éliminer d'autres diagnostics potentiels. La détection de réserves de cuivre par la coloration à la rhodamine constitue un signe pathognomonique de la maladie de Wilson, mais ne se retrouve que dans une minorité de cas (environ 10%)[78]

Dépistage génétique

Lorsque le diagnostic est posé chez un cas index, un dépistage familial est incontournable. Les probabilités de découvrir un second cas homozygote parmi l'entourage familial d'un cas index est de 25% lorsqu'il s'agit de la fratrie et de 0,5% en ce qui concerne ses enfants. Encore une fois, aucun test pris isolément n'est suffisamment sensible pour détecter un cas atteint ou un hétérozygote porteur de la maladie de Wilson avec certitude[79].

Traitement

Le traitement de la maladie de Wilson a connu plusieurs avancées depuis ses débuts et s'est considérablement raffiné depuis l'injection intramusculaire de dimercaprol. Mais l'approche thérapeutique initiale de cette maladie demeure toujours médicale.

La première classe de médicaments utilisés aujourd'hui regroupe les chélateurs de cuivre. Leur activité entraîne la mobilisation du cuivre provenant du foie et des autres réserves systémiques. Il est par la suite excrété dans l'urine. Les deux principaux membres de cette classe thérapeutique sont la pénicillamine-D et la trientine.

La pénicillamine-D constitue la première molécule réductrice de cuivre utilisée. Bien qu'efficace dans la majorité des cas, cette molécule n'est pas sans danger pour le patient. Ce traitement comporte de nombreux effets secondaires, certains aigus, d'autres chroniques. À court terme, on peut observer une aplasie médullaire, une protéinurie, une réaction d'hypersensibilité. De façon chronique, on peut noter des effets délétères sur le collagène vasculaire, des effets immunosuppresseurs, ou encore des réactions auto-immunes telles que le lupus érythémateux et le syndrome de Goodpasture[80-82]. La pénicillamine-D présente le risque non négligeable d'entraîner une détérioration des symptômes chez 50% des patients dont l'aspect neurologique du tableau est prédominant[83]. Pour cette raison, l'utilisation de cette molécule devrait être évitée comme thérapie initiale chez les patients présentant ce type de tableau.

La trientine, molécule chélatrice de cuivre au même titre que la pénicillamine, présente des effets similaires à cette dernière, mais d'une intensité moindre. L'augmentation d'excrétion du cuivre dans l'urine est moins spectaculaire. En revanche, la trientine entraîne plus rarement des effets secondaires que la pénicillamine. Leur nature demeure semblable cependant. La *Food and Drugs Administration* des États-Unis a approuvé ce médicament pour les patients intolérants à la pénicillamine.

Le zinc fait partie d'une classe thérapeutique dont il est le seul représentant. Cet élément utilise des mécanismes d'action autres que la chélation pour interférer avec l'accumulation de cuivre. C'est en s'attaquant à l'absorption du cuivre qu'il joue son rôle. En premier lieu, le zinc entre en compétition avec le cuivre au niveau des transporteurs ioniques des entérocytes intestinaux. Les deux ions utilisent les mêmes transporteurs. L'augmentation de la concentration luminale du zinc lui donne donc un avantage sur le cuivre, laissant ce dernier du côté endoluminal de la cellule digestive.

En second lieu, le zinc induit une plus grande transcription des métallothionéines au niveau des entérocytes. Comme discuté précédemment, ces protéines tampons se lient au cuivre intracellulaire. La liaison empêche le passage du cuivre au niveau sérique. Le cuivre est ensuite excrété dans les selles par desquamation des entérocytes[77]. Contrairement aux chélateurs, le zinc est une molécule très sécuritaire. Le seul effet secondaire rapporté est l'irritation gastrique chez 5 à 10% des patients[84]. Le zinc semble cependant être un traitement anti-cuivre moins incisif que les chélateurs. Son utilisation est davantage indiquée en co-thérapie ou comme thérapie de maintien.

Le tétrahiomolybdate (TM) agit via un autre mécanisme que ceux mentionnés ci-dessus. Cette molécule forme des complexes tripartites avec le cuivre, des protéines et elle-même. Les formations résultants de cette liaison sont non absorbables. Lorsque ingéré avec de la nourriture, le TM empêche donc l'absorption du cuivre. S'il est consommé sans aliments, le TM est absorbé et se retrouve au niveau sérique. La formation de complexe se produit dans ce compartiment également, entraînant une liaison entre le cuivre, l'albumine et le TM. De cette manière, il devient impossible pour les cellules d'absorber le cuivre.

Le TM présente un profil pharmacologique sécuritaire. Des cas de détérioration de l'état neurologique n'ont été observés que chez 5% des cas[85], contrairement à 50% pour la pénicillamine et près de 20% pour la trientine[86]. On retrouve une anémie et/ou une leucopénie chez 10 à 15% des patients ainsi qu'une élévation des transaminases hépatiques dans les mêmes proportions. Ces deux effets secondaires sont réversibles avec une diminution des doses.

Transplantation hépatique

Le traitement chirurgical de la maladie de Wilson occupe une place restreinte. Les patients pouvant réellement en bénéficier doivent être triés scrupuleusement. Nazer et al.[87] ont développé un index pronostic afin d'orienter les décisions thérapeutiques. Dans leur publication, les patients présentant un score de 6 ou moins survivraient grâce à

la pénicillamine, alors que les patients atteignant 7 ou plus décèderaient. Depuis l'avènement de thérapie combinée de trientine et de zinc, Brewer et al.[88] ont traité efficacement des patients atteignant un score allant parfois jusqu'à 9. Le score de Nazer demeure une référence de la sévérité de l'atteinte hépatique (Tableau 4). La transplantation hépatique n'est actuellement réservée qu'à deux classes de patients : les patients se présentant en insuffisance hépatique aiguë et les patients ne répondant pas au traitement médical. Pour tous les autres types de patients, le traitement médical demeure l'avenue thérapeutique de choix. La thérapie médicale offre actuellement une espérance de vie de loin supérieure à celle offerte par la transplantation. De plus cette option s'avère moins coûteuse et plus sécuritaire.

Il est à noter que de nombreuses recherches sont en cours afin de développer d'autres avenues thérapeutiques de type chirurgical. À ce titre, la transplantation d'hépatocytes présente de nombreux avantages sur le plan théorique. Plusieurs publications rapportent d'ailleurs des résultats encourageants dans ce domaine[89, 90].

TABLEAU 4 : Classification de l'insuffisance hépatique selon l'index pronostique de Nazer et al.

Analyses	Valeur normale	Pointage				
		0	1	2	3	4
Bilirubine sérique	0.2-1.2	<5.8	5.8-8.8	8.8-11.7	11.7-17.5	>17.5
AST	10-35	<100	100-150	151-200	201-300	>300
PTT	-	<4	4-8	9-12	13-20	>20

AST : aspartate transférase sérique

PTT : temps de prothrombine prolongé (secondes)

Tiré de Brewer et Askari J Hepato 2005[91]

Rat Long-Evans Cinnamon : modèle de la maladie de Wilson

Historique

Les rats Long-Evans Cinnamon (LEC) ont été établis en 1975 au Japon, dans les animaleries du « Center for Experimental Plants and Animals » de l'Université Hokkaido. Cette lignée origine de rats Long-Evans (LE) non consanguins. C'est afin d'obtenir une ségrégation parfaite des trois couleurs de rats (brun-noir, agouti et cannelle) que les rats étaient accouplés uniquement à l'intérieur d'une population de couleur identique[92].

C'est en 1984 que fut noté le premier cas d'hépatite au sein de la colonie. Ce rat mâle issu de la 24^e génération développa cette atteinte à l'âge de 5 mois. La progéniture de ce rat fut soigneusement étudiée afin de déterminer si les descendants présenteraient également le même phénotype d'hépatite. L'hépatite frappa effectivement chacune des générations subséquentes.

Les responsables de la colonie se sont d'abord assurés que cette atteinte n'était pas causée par un facteur pathogène externe, un virus par exemple. Ensuite, des croisements entre rats consanguins furent réalisés dans les générations qui suivirent afin de fixer l'allèle mutant et d'en assurer la persistance. Des rétro-croisements avec les rats LE des générations précédentes ont permis de reconnaître que le gène impliqué dans cette atteinte hépatique était un gène autosomal récessif[93, 94]. Puisqu'il entraînait une hépatite chez les rats atteints, ce gène fut initialement appelé hts. Il fut reconnu que le rat LEC présentait de nombreuses similarités phénotypiques avec les patients atteints de la maladie de Wilson. Ce fut la publication de Li et al. qui établit officiellement cette relation[95]. On remarqua également que la majorité des rats LEC qui survivaient à l'hépatite initiale développaient un carcinome hépatocellulaire vers l'âge d'un an[92].

Évolution clinique et similitudes avec la maladie de Wilson

Quatre-vingt pour cent des rats LEC présentent une hépatite fulminante vers l'âge de 4 mois[93]. Quatre-vingt pour cent des rats présentent des symptômes cliniques. Cette atteinte se manifeste par un ictère, une perte de poids, une oligurie, des hémorragies sous-cutanées, un ralentissement des mouvements et une difficulté à s'alimenter.

Parmi les rats présentant une hépatite, 80% mourront de cette atteinte au cours des deux semaines suivant l'apparition des symptômes. Les 20% restants survivront à leur hépatite initiale, mais la moitié d'entre eux décèderont d'une récurrence d'hépatite, tandis que l'autre moitié développeront une hépatite chronique puis un carcinome hépatocellulaire à l'âge de un an.

Les 20% non atteints par l'hépatite fulminante ne seront pas épargnés au long cours. Ils subiront une évolution similaire aux survivants de l'hépatite fulminante. L'hépatite chronique les conduira vers le cancer hépatique.

Les rats LEC accumulent des taux anormalement élevés de cuivre dans divers tissus. Le foie est le principal organe visé[96-98]. Dès l'âge de 3 mois, les concentrations hépatiques de cuivre dépassent les seuils toxiques. Les niveaux atteints sont environ 50 fois plus élevés que chez des rats LEA contrôles[95]. Les reins et le cerveau sont également la cible de l'accumulation de cuivre. Au niveau rénal les concentrations atteignent 1,8 fois la normale et ce, dès l'âge de 8 mois. Pour leur part, les niveaux cérébraux sont 70% supérieurs aux rats LEA contrôles à 8 mois.

Tout comme les patients atteints de la maladie de Wilson, les rats LEC présentent des taux sériques de céruloplasmine particulièrement faibles. Ces taux peuvent être au-delà de 150 fois plus faibles que ceux d'un rat LEA contrôle. Les taux d'excrétion biliaire du cuivre sont également réduits de manière significative.

L'analyse histologique du foie d'un rat LEC démontre des gouttelettes lipidiques incluses au niveau cytoplasmique, une anisocytose, un pléiomorphisme nucléaire et mitochondrial. Cette description, bien que peu spécifique d'une atteinte hépatique en particulier, peut parfaitement correspondre à la description histologique de la maladie de Wilson.

Tel que discuté dans la section sur le traitement de la maladie de Wilson, la D-pénicillamine est un agent chélateur de cuivre permettant la diminution du cuivre hépatique. De la même manière, il est possible de prévenir l'apparition de l'hépatite fulminante chez le rat LEC en le traitant avec la D-pénicillamine. Ce traitement a su prévenir l'élévation des transaminases hépatiques et éviter les changements histologiques. La concentration hépatique et sérique de cuivre était diminuée chez les rats traités alors que leur concentration urinaire était augmentée[99]. La réponse des rats LEC à la D-pénicillamine est très semblable aux effets observés chez les patients atteints de la maladie de Wilson. Le traitement des rats LEC à long terme avec la D-pénicillamine ou la trientine empêche la carcinogénèse au niveau hépatique[100, 101]

Différences entre le rat LEC et la maladie de Wilson

Bien que la ressemblance phénotypique soit particulièrement grande entre le rat LEC et la maladie de Wilson, certaines caractéristiques demeurent spécifiques à l'un ou à l'autre. L'anneau cornéen de Kayser-Fleischer n'est retrouvé que chez les patients humains. Les rats ne présentent pas cette caractéristique[102]. Le taux de carcinogénèse hépatique diffère énormément. Les rats survivant aux hépatites développeront quasi invariablement un cancer hépatique. La prévalence de cette atteinte chez les rats LEC dépasse les 90%[103]. En contre partie, l'événement est particulièrement rare chez l'humain. Seulement 12 cas d'hépatocarcinome ont été décrits chez des patients atteints de la maladie de Wilson[104].

Gène ATP7B

Le gène ATP7B est retrouvé à la position q12.23-12.3 du chromosome 16 chez le rat[105]. L'homologie entre le gène humain et le gène du rat est de l'ordre de 82%[106]. La délétion rapportée par Wu et al. [107] englobe au moins 900 paires de bases à l'extrémité 3' de la région codante et 400 paires de bases additionnelles dans la région non traduite. Cette délétion retire la partie d'information codant pour le site liant l'ATP. La protéine découlant de ce gène ne peut occuper sa fonction de transporteur de cuivre.

Contexte d'oxydation et effets sur l'ADN

L'accumulation de cuivre dans les hépatocytes des rats LEC expose ces cellules à un stress oxydant très important. Les détails de cette condition seront exposés dans la section suivante. Notons toutefois, à ce sujet, les conclusions de certaines études significatives. L'équipe de Yamamoto et al. [108] et celle de Nakamura et al.[109] ont toutes deux démontré une production importante de radicaux hydroxyle dans le foie des rats LEC atteints d'hépatite fulminante. Parallèlement à ces deux études, Hayashi et al.[110] ont fait la démonstration que l'accumulation de cuivre au niveau hépatique induisait des cassures des brins d'ADN, alors que le fer n'entraînait pas ce genre de modifications.

Stress oxydant

Les radicaux libres sont le produit normal de divers mécanismes physiologiques nécessaires à la survie cellulaire. À dose adéquate, leur présence s'avère utile pour le fonctionnement de la cellule. Leur surproduction endogène ou certains phénomènes toxiques exogènes peuvent entraîner un stress oxydant. Le stress oxydant se définit comme une situation où la cellule ne contrôle plus la présence de radicaux oxygénés toxiques.

Les radicaux potentiellement retrouvés au sein des cellules vivantes peuvent être séparés en deux groupes soient les radicaux primaires, formés de composés radicalaires physiologiques, et les radicaux secondaires, formés par les réactions des composés primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions d'électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} [111]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être les précurseurs de plusieurs radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé *espèces réactives de l'oxygène (ERO)*[112]. (Figure 5)

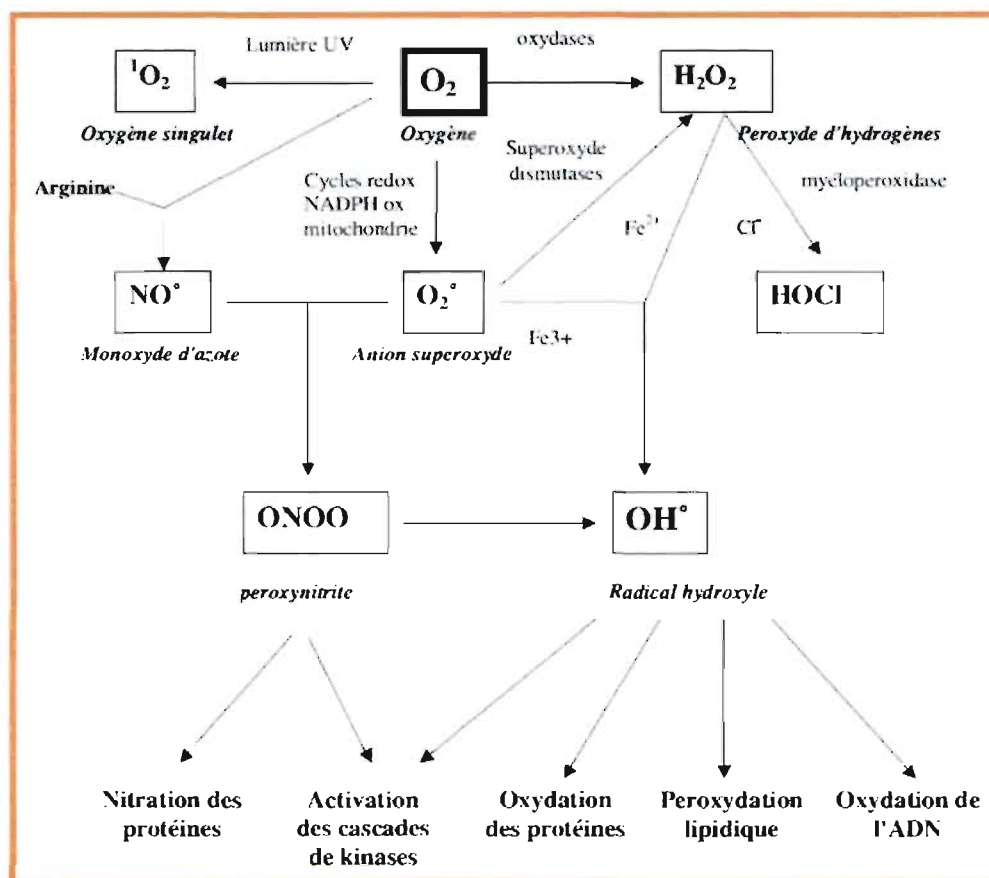
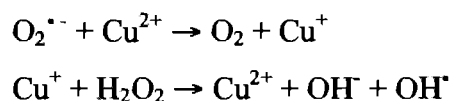


FIGURE 5 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie

Tiré de Favier A. Actualité Chimique 2003[112]

La réactivité de chaque radical de l'oxygène varie selon sa nature. Ainsi l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) n'est pas très réactif, alors que des radicaux tels les peroxydes (ROO^{\bullet}) ou surtout les hydroxyles (HO^{\bullet}) sont extrêmement réactifs avec la plupart des molécules biologiques.

Plusieurs effets délétères d'une surcharge en cuivre sont attribuables aux dommages oxydatifs entraînés par cette surcharge. À titre de métal actif dans l'oxydation-réduction, les ions de cuivre catalysent la formation de radicaux hydroxyles très réactifs à partir d'espèces moins réactives telles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Cette genèse de radicaux libre se fait par une réaction appelée réaction de Fenton :



Gestion cellulaire des ERO

Les cellules disposent de divers mécanismes antioxydants pour contrôler la production physiologiques d'ERO. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou en ions stables[113]. La vitamine piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ce type d'antioxydant est appelé « *scavenger* »[112], ou piègeur. Certains produits endogènes, dont le GSH, jouent un rôle similaire aux piègeurs exogènes.

L'autre stratégie adoptée pour exercer un contrôle sur les ERO fait appel aux enzymes. Ce sont principalement les SOD qui se chargent de cette tâche en éliminant l'anion superoxyde par une réaction de dismutation. Cette réaction produit une molécule de peroxyde d'hydrogène et une molécule d'oxygène à partir de deux superoxydes. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme. La nature

de cet atome métallique permettra de distinguer la fonction d'une SOD donnée. Ainsi, une SOD à cuivre-zinc se retrouvera au niveau du cytosol, alors que la SOD à manganèse protégera la mitochondrie. Les glutathion peroxydases (GPX) prennent part à l'activité antioxydative de la cellule non seulement en détruisant le peroxyde d'hydrogène, mais également d'autres peroxydes organiques toxiques. Les rôles des SOD et des GPX semblent complémentaires et nécessaires à une bonne protection antioxydante.

Surproduction d'ERO

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides[112].

Les lipides peuvent effectivement faire l'objet d'une attaque par le radical hydroxyle et former un radical diène conjugué. Ce diène est ensuite oxydé en radical peroxyde. Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, forme une cascade en boucle car le radical peroxyde se transforme en peroxyde au contact d'un acide gras, formant ainsi un nouveau diène conjugué[114]. Cette réaction en chaîne peut ultimement contribuer à l'oxydation de l'ADN.

L'ADN peut également être la cible d'attaques directes des ERO. Cinq classes principales de dommages oxydatifs peuvent être générés. Ces atteintes sont principalement médiées par le radical hydroxyle. On retrouve parmi elles l'oxydation des bases par l'action radicalaire directe, la formation de sites abasiques secondaire à l'attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose. Si le désoxyribose est atteint directement, on retrouvera alors des coupures d'un brin de l'ADN. Si les dommages sont créés indirectement par la peroxydation des lipides, ce seront les aldéhydes générés par cette peroxydation qui formeront à leur tour des adduits intra-caténaux[115].

Lorsque l'attaque radicalaire se fait au niveau des protéines qui entourent et interagissent avec l'ADN, des ponts ADN-protéines sont formés.

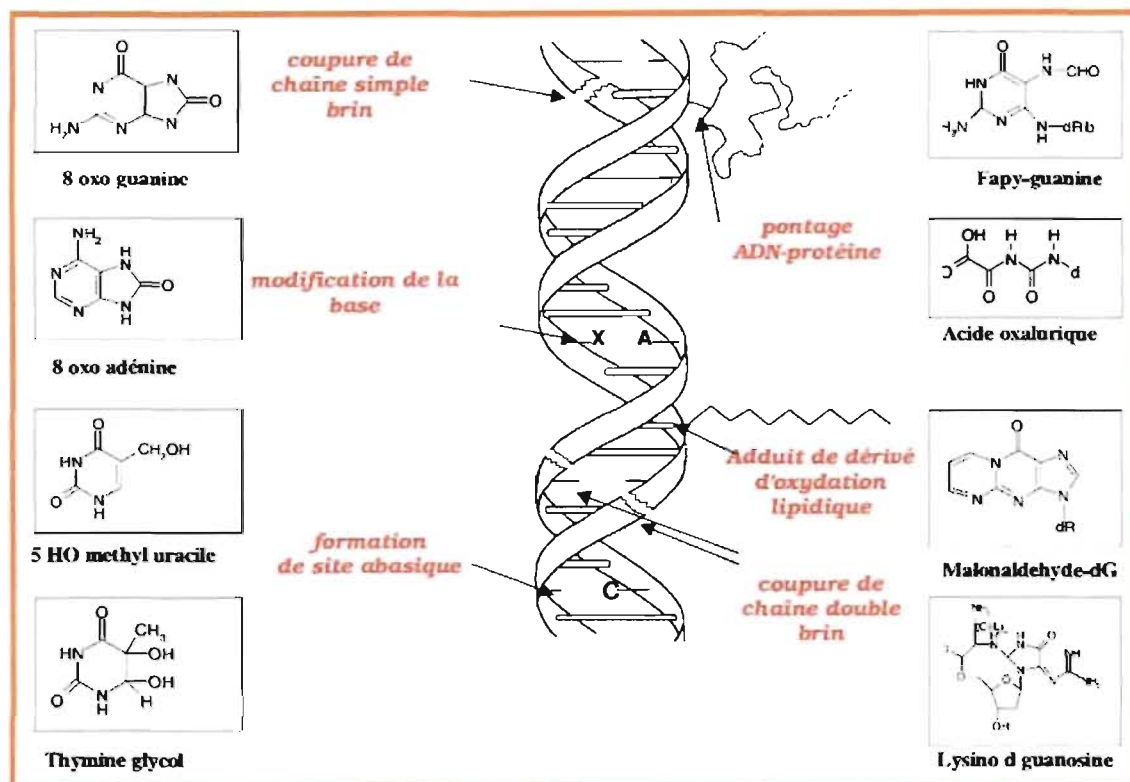


FIGURE 6 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules

Tiré de Favier A. Actualité Chimique 2003[112]

Bien qu'un système élaboré de réparation soit en place dans les cellules pour faire face à ce genre d'attaque à l'ADN, les modalités destinées à répondre aux 10^4 lésions quotidiennes attendues dans une cellule normale peuvent rapidement être submergées en situation de stress oxydant. Dans cette situation pathologique, les lésions laissées en place entraîneront des erreurs de transcription et de traduction lors de synthèses protéiques futures (mutation ponctuelle) ou à une impossibilité de copier l'ADN. Dans ce second scénario, l'apoptose est déclenchée.

Apoptose

Introduction

Les hépatocytes entrent continuellement en contact avec des substances au fort potentiel toxique. Ces cellules réussissent néanmoins à survivre grâce à des mécanismes de protection et de réparation. Une exposition répétée ou prolongée peut cependant s'avérer délétère pour les hépatocytes, voire entraîner la mort de ceux-ci.

La mort des hépatocytes se produit par deux mécanismes : la nécrose et l'apoptose. L'exposition à un agresseur peut entraîner parallèlement les deux mécanismes chez les cellules. On peut retrouver à la fois les stigmates cellulaires de la nécrose et ceux de l'apoptose au sein d'un même tissu voire d'une même cellule [116].

La nécrose se définit par un déséquilibre métabolique majeur associé à de faibles réserves énergétiques (pertes d'ATP) et une turgescence des mitochondries et de la cellule dans son ensemble. Les enzymes de dégradation sont activés lors du processus. La résultante de cette chaîne d'événement est la lyse cellulaire et l'éparpillement du contenu cellulaire dans l'espace environnant. Cette destruction cellulaire entraîne inévitablement une réaction inflammatoire.

En contre partie, l'apoptose est une mort programmée. Cette forme d'élimination cellulaire est engendrée par une cascade d'événements dépendant de l'ATP cellulaire. L'apoptose se caractérise par une condensation de l'ADN, une fragmentation nucléaire (la pycnose) et le rétrécissement et le morcellement de la cellule. Les fragments cellulaires, appelés corps apoptotiques, sont tous entourés d'une membrane lipidique. Les cellules avoisinantes phagocytent les corps apoptotiques[117, 118].

Un autre mécanisme cellulaire pourrait être impliqué dans la réponse cellulaire à une agression. La macroautophagie (ou autophagie) constitue un processus intra-cellulaire au cours duquel des structures cytoplasmiques et des organelles sont séquestrées au sein

d'une double-membrane lipidique. Cette capsule lipidique est fusionnée à un lysosome ou une vacuole et son contenu est dégradé en structures plus élémentaires et recyclé[119]. Ce mécanisme est habituellement observé lorsque les cellules sont privées de nutriments ou de facteurs de croissance. Ce recyclage permet aux cellules de maintenir une production minimale d'ATP durant une période de jeûne.

L'autophagie pourrait remplir une autre fonction que celle de source d'énergie alternative. Au moment de la dégradation des organelles, certains signaux pourraient encourager la dégradation des organelles endommagés ou moins fonctionnels. Cette particularité s'avèrerait significative lorsqu'il est question des mitochondries, puisque les mitochondries produisant moins d'ATP et plus d'ERO.

Malgré ses capacités à maintenir certaines cellules en vie dans des situations précaires, l'autophagie ne semble pas être un gage d'immortalité pour les cellules qui emploient ce mode de survie. En effet, l'aboutissement de ce processus semble parfois être une mort cellulaire programmée non-apoptotique. Mais l'apoptose et la mort programmée non-apoptotique semblent avoir certaines relations entre-elles. Des données portent même à croire que l'équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourrait orienter une cellule destinée à mourir vers l'une ou l'autre des méthodes de mort programmée[120]. Les données actuelles ne permettent cependant pas de déterminer avec certitude quelles cellules mammifères utilisent ce mécanisme.

De leur côté, l'apoptose et la nécrose surviennent presque toujours de pair dans un tissu initialement sain. L'implication relative de chaque mécanisme de mort cellulaire peut cependant varier considérablement[116]. L'apoptose a été rapportée dans les atteintes hépatiques aiguës[121, 122] comme dans les atteintes chroniques.

Mécanismes

Bien que de nombreuses voies de signalisation puissent mener à l'apoptose, seulement deux d'entre-elles ont été parfaitement élucidées. La première repose sur la présence et

l'activité des récepteurs de mort situés sur la membrane cellulaire. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs TNF/NGF (« nerve growth factor »). Les hépatocytes expriment divers types de récepteurs de cette superfamille, dont Fas (CD95), TRAIL-R1, TRAIL-R2 et TNF-R1[123]. Les récepteurs de mort s'intègrent à la membrane cytoplasmique en présentant le site de liaison de la portion N-terminale à l'extérieur de la cellule et le domaine de mort retrouvé sur la portion C-terminale à l'intérieur. Ces récepteurs utilisent l'activation des caspases comme mécanisme de signalisation afin d'assurer la continuité du message entre la liaison du ligand à la surface cellulaire et l'activation de l'apoptose[124-126].

L'autre mécanisme implique la participation de la mitochondrie. Cet organelle relâche dans le cytosol des protéines activant d'autres protéines cytosoliques, qui elles déclenchent l'apoptose[126, 127].

Les voies d'activation par les récepteurs de mort et par la mitochondrie sont souvent appelées voie extrinsèque et intrinsèque, respectivement. Bien que souvent étudiées et décrites séparément, et bien que chacune puisse activer l'apoptose indépendamment de l'autre, des interactions sont possibles entre ces deux voies afin d'amener la cellule au suicide. Ces interactions ont cependant lieu à des moments bien précis de la cascade apoptotique et elles impliquent des acteurs spécifiques.

Caspases

Les caspases sont une famille de protéases intracellulaires dont les membres clivent leur substrat au niveau de l'acide aspartique. Le nom de caspase est d'ailleurs un acronyme pour *Cysteine Aspartyl-specific Proteases*[128]. Ces protéines sont présentes sous forme de zymogènes inactifs dans le cytosol des cellules d'une très large majorité de cellules animales. Lors de leur activation, la zymogène sous forme de pro-protéine est clivée en deux sous unités. La plus grande mesure environ 20 kDa alors que la plus petite mesure environ 10 kDa. Cette séparation des deux sous-unités libère un prodomaine au niveau de la portion N-terminale. L'enzyme actif consiste en un

hétérotétramère composé de deux grandes sous-unités et deux petites sous-unités. Chacun de ces nouveaux hétérotétramère comporte deux sites actifs[129, 130].

Chez l'humain et la souris, environ 14 caspases ont été découvertes. En les classant par fonction, on peut les diviser en trois catégories : inflammatoires, initiatrices et effectrices[124].

Les caspases inflammatoires sont nommées ainsi car la plus connue d'entre toutes, la caspase 1, a comme substrat la pro-interleukine 1 β et la pro-interleukine 18, deux cytokines jouant un rôle critique dans les réactions inflammatoires de l'organisme. Les caspases inflammatoires sont en fait des caspases comportant toutes un domaine CARD dans leur portion N-terminale. Alors que le rôle de la caspase est clair au sein du processus inflammatoire, les substrats des autres caspases inflammatoires restent à définir[131].

Pour leur part, les caspases initiatrices jouent un rôle précocement dans la cascade menant à l'apoptose. Elles disposent d'un large prodomaine sur leur portion N-terminale. Ce prodomaine sert de module d'interaction protéique et permet une interaction avec diverses protéines qui activent les caspases. La caspase 8 constitue sans doute la protéine initiatrice la plus étudiée. Dans la voie intrinsèque, une série de protéines interagissent entre elles pour assurer le relais du domaine cytosolique des récepteurs TNF/NGF au zymogène de caspase 8. Cet échafaudage protéique entraîne le recrutement de d'autres pro-caspases 8. Cette masse critique de zymogènes permettra à ces pro-caspases 8 de s'activer les unes les autres. En effet, ce phénomène d'auto-activation peut s'expliquer par le modèle de proximité induite[132]. Ce modèle se base sur l'observation que les zymogènes comportent une faible activité protéase (de l'ordre de 1% de l'activité des enzymes activées). Lorsqu'elles sont intimement accolées, les pro-caspases peuvent donc « s'inter-cliver » pour produire des caspases parfaitement actives[118].

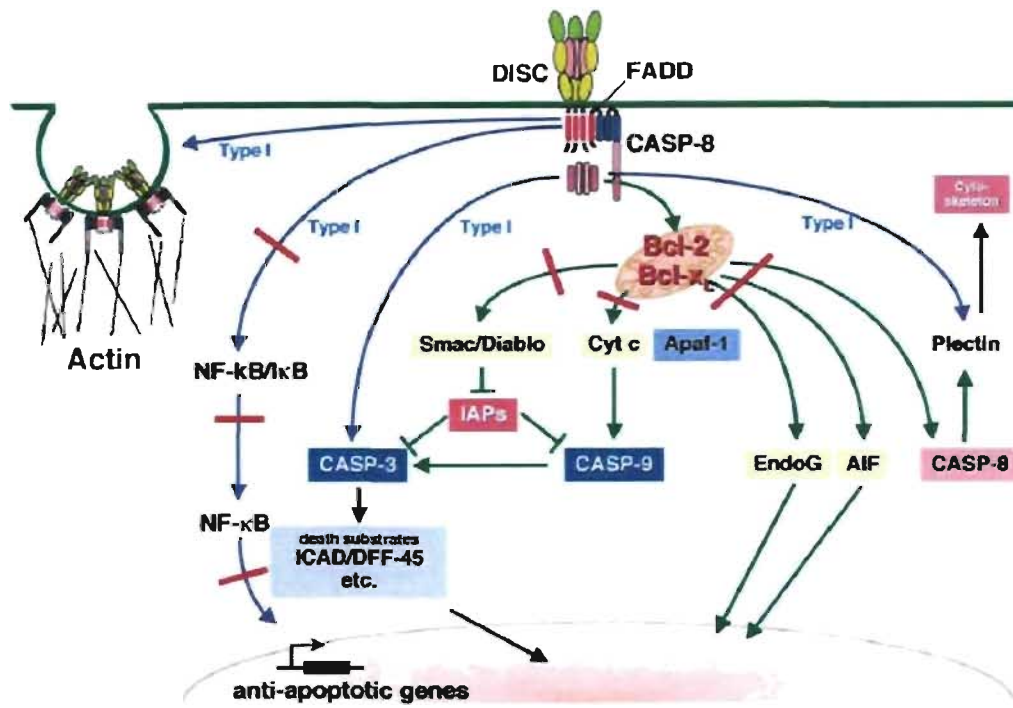
Contrairement aux caspases initiatrices, les caspases effectrices comportent seulement une courte portion N-terminale, portion qui n'occupe d'ailleurs aucune fonction

apparente[118]. D'un point de vue fonctionnel, les caspases effectrices occupent une place en amont de la place réservée aux caspases initiatrices. Leur activité est d'ailleurs largement dépendante de celle des caspases initiatrices. Les caspases initiatrices exercent leur activité protéolytique sur les caspases effectrices, propageant ainsi le signal apoptotique. Ce sont ensuite les caspases effectrices qui, à leur tour, clivent les substrats contribuant à complétion du mécanisme d'apoptose. Les substrats de ces caspases comportent entre autre des protéines kinases et autres protéines-signal, des protéines du cytosquelette et de la matrice nucléaire et des protéines de réparation d'ADN[124, 129, 130].

Voie mitochondriale

Des études sur les voies d'activation de l'apoptose ont démontré que les mécanismes utilisés par les cellules variaient selon la nature de celles-ci. Les cellules de type I présentent une dépendance importante à l'activation des récepteurs de mort et à la cascade des caspases qui s'en suit. Pour leur part, les cellules de type II se basent sur la mitochondrie comme système de propagation du signal apoptotique. Selon le type de cellule et le stimulus engendrant l'apoptose, la mitochondrie joue donc un rôle mineur ou crucial dans la cascade de l'apoptose. Les hépatocytes sont des cellules de type II[133, 134]. La mitochondrie joue donc un rôle de premier plan dans l'apoptose des hépatocytes[116, 135, 136].

The Type I CD95 Signaling Pathway



The Type II CD95 Signaling Pathway

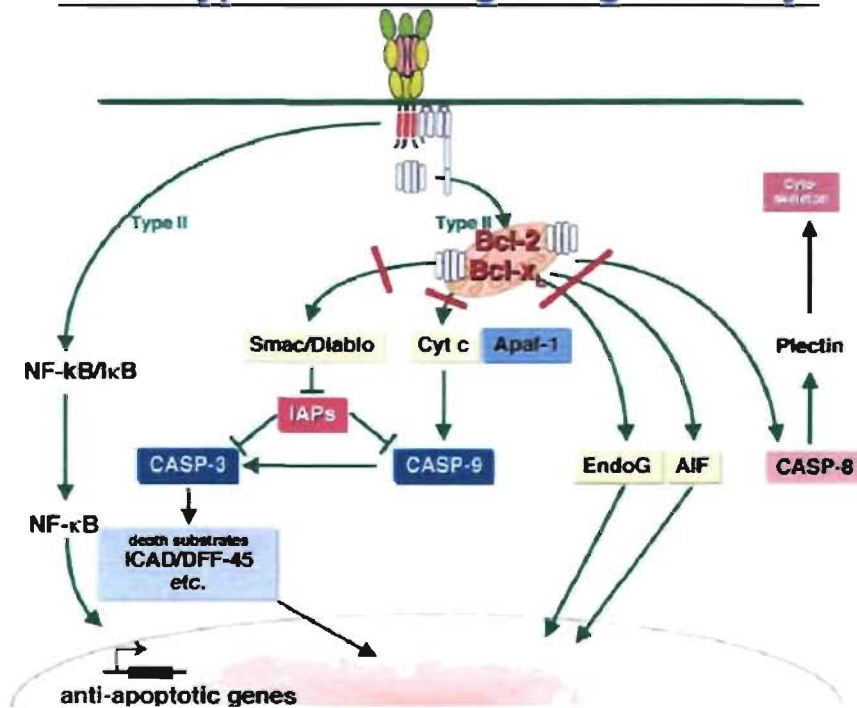


FIGURE 7 : Mécanisme d'apoptose selon le type cellulaire (type I ou type II)

Tiré et modifié de : Barnhart et al. *Semin Immuno* 2003[137]

Dans des conditions normales, la membrane interne de la mitochondrie contient le complexe de protéines de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase[138]. En présence d'un stimulus d'apoptose, l'intégrité de la barrière est compromise. La mitochondrie relâche alors des facteurs apoptotiques provenant de l'espace intermembranaire mitochondrial. La perte d'intégrité de la membrane mitochondriale entraîne également la perte du gradient électrique entre l'espace intermembranaire et le cytosol[139]. Cette augmentation de perméabilité de la membrane mitochondriale porte le nom de transition de perméabilité mitochondriale (TPM). La production d'ATP est brutalement abolie et les électrons de la chaîne respiratoire sont relâchés au niveau cytosolique où ils forment des ERO[140].

La TPM est initiée par l'ouverture de pores dans la membrane mitochondriale. Plusieurs modèles ont été développés afin d'expliquer ce phénomène. Le premier avance que certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 seraient polymérisés afin de former un pore au travers duquel s'échapperaient les protéines apoptotiques. Le second modèle est basé sur les données rapportant l'existence d'un complexe protéique connu sous le nom de pore de transition de perméabilité (PTP). Ce pore libérerait les protéines intermembranaires sous l'influence d'un stimulus apoptotique. La prédominance de l'un ou de l'autre des mécanismes entraînant le TPM varie selon la nature du stimulus apoptotique[141, 142]. Kroemer et *al.* ont présenté un autre modèle basé sur la rupture de la membrane mitochondriale engendrée par une TPM de grande amplitude[143]. Les travaux présentés dans le présent ouvrage se concentrent essentiellement sur le premier des trois modèles.

Protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 ont été très conservées au cours de l'évolution. Des protéines homologues sont retrouvées chez les mammifères, les oiseaux, les poissons, les amphibiens ainsi que chez les invertébrés tels *C. elegans*, *Drosophila* et les éponges de mer. Elles jouent un rôle crucial dans l'homéostasie mitochondriale. Cette famille de

protéines contient des membres pro et anti-apoptotiques susceptibles d'interagir entre eux par homo ou hétéro-dimérisation et ainsi réguler l'apoptose originant de la mitochondrie (figure 9)[144, 145].

L'équilibre entre les influences pro et anti-apoptotiques détermine la réponse cellulaire au stimulus apoptotique. Le ratio relatif des protéines anti et pro-apoptotiques dicte la sensibilité ou la résistance des cellules aux stimuli apoptotiques[118]. Tant que les protéines protectrices sont en nombre suffisant, la balance penchera en faveur de la survie de la cellule[146]. Cette réponse cellulaire par l'entremise de l'équilibre pro/anti-apoptotique semble être une très répandue. Le phénomène a été observé en réponse à des stimuli aussi divers que l'hypoxie, les radiations, les oxydants, des molécules anti-néoplasiques et des surcharges en Ca^{2+} . Mais ce mécanisme d'adaptation à l'environnement cellulaire peut être altéré. Il devient alors l'événement physiopathologique responsable d'une trop grande ou une trop faible mort cellulaire. Un tel déséquilibre dans le mécanisme de régulation entraîne la dérive de l'organisme vers diverses pathologies dont le cancer, certaines atteintes autoimmunes telles que le lupus, les atteintes d'ischémie-reperfusion impliqués dans les accidents vasculaires cérébraux et dans les infarctus du myocarde. [118]

Structure et fonction

De par leur conformation tridimensionnelle, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être séparées en deux groupes distincts. Les membres du premier groupe comportent des domaines leur permettant de former des pores. Les protéines adoptent une conformation d'hélice- α . Ce groupe est autant formé de protéines anti-apoptotiques, telles Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W et possiblement Boo, que de leurs contreparties pro-apoptotiques, en l'occurrence Bax, Bak, Bok et Bid. La majorité des protéines de cette catégorie peuvent être reconnues par les séquences homologues préservées, dont les domaines *Bcl-2 homology (BH) domains* BH1, BH2, BH3 et parfois BH4. Les protéines qui ont fait l'objet d'expérimentation ont toutes démontré une capacité à former des canaux ioniques au sein de membranes synthétiques *in vitro* [147-151].

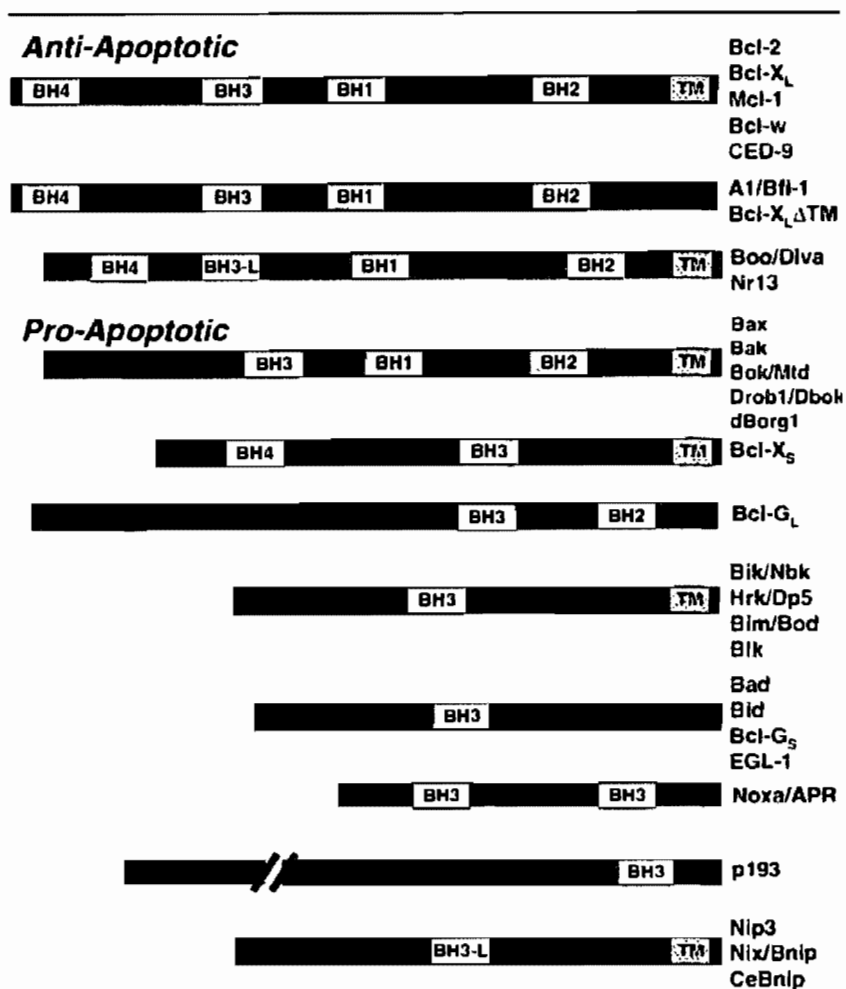


FIGURE 8 : La famille des protéines Bcl-2

Cette représentation schématique des protéine Bcl-2 démontre l'expression et la localisation relative des domaines « Bcl-2 homology » (BH) (Tiré et modifié de Reed J.C. Amer J Pathol 2000)[152]

Le second groupe rassemble uniquement des protéines pro-apoptotiques. Leur seul trait en commun semble être la présence du domaine BH3. Les Bad, Bik, Bim, Hrk, Bcl-G_s, p193 et APR (Noxa) se dimérisent avec les protéines anti-apoptotiques et en inhibe l'action. Les protéines ciblées sont classiquement Bcl-2 et Bcl-XL [153]. Le domaine BH3 semble être le médiateur principal de la dimérisation entre les protéines de la famille Bcl-2. On observe d'ailleurs que des mutations au sein du domaine BH3

empêchent des protéines comme Bad, Bik, Bim, Hrk et Bcl-G_S de se lier aux autres membres de la famille Bcl-2, abrogeant ainsi son activité pro-apoptotique. Il est important de noter que toutes les interactions impliquant BH3 n'ont pas nécessairement un effet antagoniste. Par exemple, la liaison du domaine BH3 de Bid à Bax semble activer Bax, favorisant son insertion dans la membrane mitochondriale et lui permettant d'adopter une conformation cytotoxique[154, 155].

Localisation cellulaire

Les membres de la famille Bcl-2 sont retrouvés à divers endroits de la cellule. Les anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L, et A1/Bfl-1 et la pro-apoptotique Bak sont intégrées à la couche externe de la membrane mitochondriale. Ces protéines comportent une séquence d'acides aminés hydrophobes près de leur portion C terminale. Cette portion transmembranaire leur permet donc un ancrage dans la membrane externe de la mitochondrie. On retrouve également certaines de ces protéines à la surface du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. Leur fonction dans la régulation de la mort cellulaire apparaît cependant moins évident au sein de ces compartiments[156]. La modulation de la concentration cellulaire de calcium compte parmi les hypothèses actuellement débattues. De leur côté, les pro-apoptotiques Bax, Bid et Bad ne comportent pas de domaine transmembranaire dans la portion C-terminale. Elles sont retrouvées dans le cytosol et y sont séquestrées par diverses protéines cytosoliques [157].

Propagation du signal apoptotique

Lorsque la mitochondrie est dans un état stable, les protéines anti-apoptotiques inhibent l'apoptose par diverses interactions avec les pro-apoptotiques. C'est entre autre en liant Bax et Bak que Bcl-2 et Bcl-X_L empêchent la relâche du cytochrome c et de la protéine Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP (inhibition of apoptosis protein) binding protein with low pI) [158-161]. Un stimulus qui déclenche

la cascade apoptotique en vient à activer la caspase 8. Cette caspase clive Bid en tBid (Bid tronquée), exposant ainsi le domaine BH3 et la portion hydrophobe située au cœur de la protéine. La portion hydrophobe nouvellement révélée semble être responsable de l'insertion de la protéine dans la membrane mitochondriale[149, 162, 163]. L'activation de Bid par la caspase 8 représente un important point d'interaction entre la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et la voie mitochondriale (intrinsèque)[164].

C'est la déphosphorylation qui permet que Bad soit relâché par la protéine de séquestration 14-3-3[146]. Diverses protéines kinases dont Akt (PKB), PKA, Raf1, Rsk1 et Pak1, ont une action phosphorylante sur Bad. Ces kinases empêchent ainsi la dimérisation de Bad avec Bcl-2 et Bcl-X_L, et donc son effet antagoniste sur ces protéines [165, 166]. Certaines données rapportent que c'est précisément par ce mécanisme de phosphorylation que serait inactivé BAD dans certains cancers[166]. Pour sa part, Bax est présent dans le cytosol malgré qu'il contienne une portion transmembranaire au niveau C-terminal. Son domaine transmembranaire serait masqué dans des conditions cytosoliques normales[167]. En présence d'un signal apoptotique, le changement de conformation et la formation d'oligomères permettraient sa translocation et son insertion au sein de la membrane mitochondriale(figure 9).

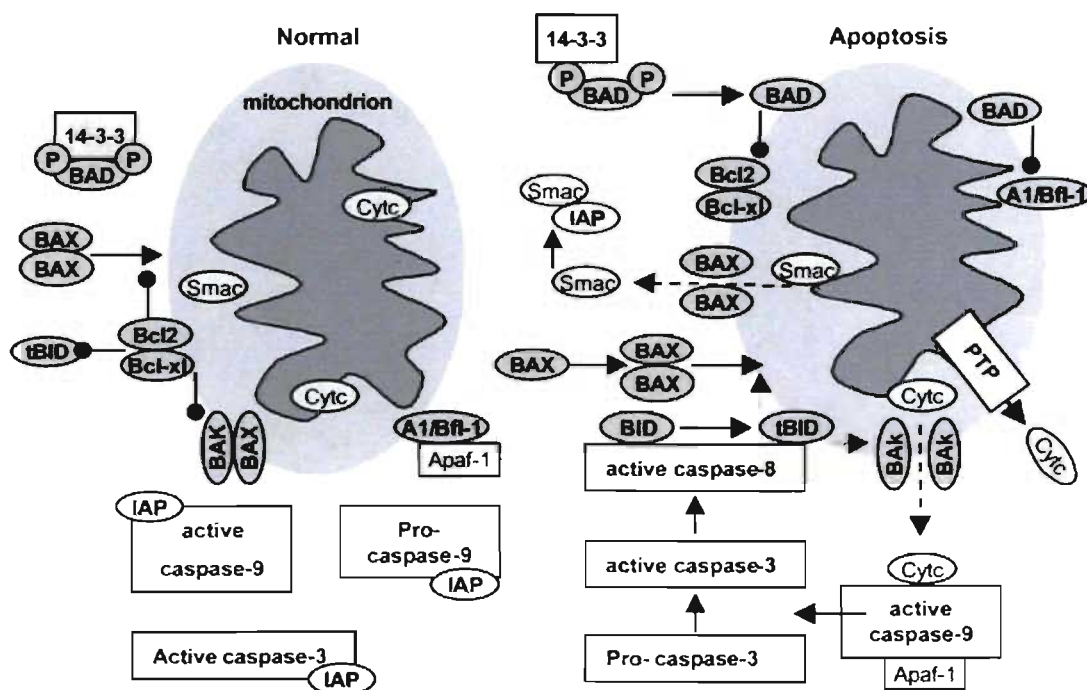


FIGURE 9 : Modification des interactions entre les protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la mitochondrie en situation d'apoptose

Tirée et modifiée de Schoemaker MH et MoshageH Clinical Science 2004

L'action exacte qu'exerce chaque protéine une fois son intégration à la membrane mitochondriale demeure un sujet de discussion au sein de la communauté scientifique[156, 168]. Certaines hypothèses ont cependant été mises de l'avant. Une fois intégrée au sein de la membrane, Bad antagoniserait l'activité des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L[169]. tBid, Bak et Bax s'associeraient sous forme tétramérique pour former des canaux laissant s'échapper le cytochrome c.

La relâche du cytochrome c par la mitochondrie est une étape charnière dans le déroulement de l'apoptose. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1, dATP et la pro-caspase 9 afin de former l'apoptosome, une structure protéique capable d'activer les caspases. La caspase 9 activée au sein de l'apoptosome est mesurée d'activer la caspase 3, caspase effectrice de premier plan dans la complétion de l'apoptose. L'apoptosome joue également un rôle d'amplification de la

cascade apoptotique par le biais de la caspase 9. Cette dernière clive également la protéine Bid, les pro-caspases 8 et 6 en plus de participer à l'activation de d'autres caspase 9 par le mécanisme de proximité[170]. Les autres protéines relâchées lors de la TPM contribuent également à la propagation du signal apoptotique. Smac/DIABLO se liera aux protéines de la famille IAP, les empêchant ainsi de jouer leur rôle d'inhibition des caspases actives.

Méthodes d'étude de l'apoptose

De multiples méthodes ont été mises au point pour mettre en évidence et étudier le phénomène de l'apoptose au sein des tissus et des cellules d'intérêt. Les diverses techniques se basent sur des caractéristiques spécifiques découlant de la progression des réactions précédemment décrites. Bien qu'il soit hors du spectre du présent ouvrage de faire une revue exhaustive de ces techniques et de leurs caractéristiques respectives, il demeure pertinent de dresser un tableau général des méthodes disponibles et de la rationnelle qui leur sert d'assises.

L'annexine V est un anticoagulant se fixant préférentiellement sur les phospholipides chargés négativement. Une des étapes précoces de la cascade apoptotique consiste en une déstabilisation de la membrane de phospholipides externe. Les phosphatidylserines sont alors exposées au niveau de la portion externe de la membrane cytoplasmique. L'annexine V marquée à l'aide d'un agent fluorescent permet d'identifier les cellules exposant des phosphatidylserines.

La caspase 3 constitue une cible intéressante pour monitoriser l'apoptose cellulaire. Tel que mentionné ci-haut, la caspase 3 est une caspase effectrice de premier plan. Une cellule présentant des caspases 3 activées se dirige tout droit vers l'apoptose. La pro-caspase 3 pèse 32 kDa, alors que la caspase 3, sa forme activée, pèse 18 kDa. De nombreux anti-corps monoclonaux ont été développés afin de cibler uniquement la forme de 18 kDa, mettant ainsi en évidence les cellules vouées à la mort par apoptose.

La méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) les fragments d'ADN, un phénomène tardif dans le processus d'apoptose. Une molécule de dUTP marquée est intégrée à la portion 3'-OH des brins d'ADN fragmentée. Ces molécules permettent ensuite de révéler la présence de ces brins d'ADN.

Une autre technique repose sur la capacité des certains anticorps monoclonaux de souris lient spécifiquement aux brins simples d'ADN. Ces anticorps étaient initialement utilisés pour mesurer les dommages qu'induisent les agents alkylants sur l'ADN[171, 172]. Son application subséquente à la détection de l'apoptose est basé sur le fait que, tout comme le font les agents alkylants, l'apoptose induit des bris d'ADN qui diminuent la stabilité de l'ADN lorsque cette dernière est déroulée par l'action de la chaleur. Des modifications sur la solution baignant les cellules étudiées ont par la suite permis de rendre les anticorps spécifiques aux dommages d'ADN causés par l'apoptose. La sensibilité et la spécificité de cette technique a d'ailleurs été reconnue par le travail de Frankfurt *et al*[173].

Apoptose chez le rat LEC

Plusieurs équipes de chercheurs ont déjà contribué à la caractérisation de l'apoptose chez le rat LEC. Leist *et al.*[174] et Saile *et al.* [175], entre autres, ont rapporté la présence du phénomène apoptotique dans différents modèles d'atteintes hépatiques de type inflammatoire.

Kato *et al.*[176] sont sans doute parmi les premiers à avoir su mettre en évidence l'apoptose dans le tissu hépatique des rats LEC. Depuis la parution de cet article, plusieurs autres ont confirmé cette observation par diverses méthodes techniques.

C'est par la méthode de TUNEL que le groupe de Kato *et al.* ont initialement démontré des phénomènes apoptotiques dans l'hépatite fulminante chez le rat LEC. Yamate *et al.* sont par la suite venus confirmer ces observations par la même technique[177].

En 2003, Santon *et al.*[178] ont étudié l'apoptose chez le rat LEC en comparant deux méthodes d'immunohistochimie. Selon ces auteurs, les travaux présentés par Grausl-Kraupp *et al.*[179] justifiaient de confronter les deux techniques. En effet, les travaux de cette dernière équipe semblaient démontrer que la méthode TUNEL manquait de spécificité quant au type de mort cellulaire qu'elle permettait de détecter. Ainsi dans cette étude, des hépatocytes morts par d'autres mécanismes étaient malgré tout marqués comme positifs par la méthode de TUNEL. Santon *et al.* ont illustré l'effet protecteur du zinc chez le rat LEC, tout en illustrant, en parallèle, la plus grande spécificité de la technique aux anticorps monoclonaux se liant aux simples brins d'ADN pour détecter l'apoptose dans le même modèle.

Le dosage de l'activité de la caspase 3 a également été utilisé afin de documenter et d'étudier l'apoptose chez le rat LEC. Les résultats à ce sujet ne sont cependant pas unanimes. Certains auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la caspase 3 au niveau hépatique de concert avec d'autres stigmates confirmant l'apoptose d'hépatocytes chez les rats LEC étudiés[180]. D'autres n'ont cependant pas été en mesure de mettre en évidence une augmentation de l'activité de la caspase 3 au niveau hépatique, alors que les tissus cérébraux des rats LEC étudiés présentaient des niveaux élevés de la forme activée de cette caspase.

Malgré le petit nombre de rat inclus dans leur étude, Klein *et al.*[181] ont publié des travaux permettant de dresser l'ébauche de la liste des modulations génétiques que subissent les rats LEC dans l'hépatite fulminante. En ce qui a trait à l'apoptose, il est intéressant de constater que des gènes tels Bcl-2, Fas et caspase 3 semblent être surexprimés à plus ou moins grande échelle selon le degré d'atteinte hépatique du rat étudié. Encore une fois, le petit nombre d'animaux inclus dans l'étude, soit 1 par groupe, restreint considérablement l'impact des conclusions qu'ont pu en tirer les auteurs.

Hypothèse

Les connaissances actuelles concernant la maladie de Wilson dressent un portrait assez étoffé du défaut dans le transport cellulaire du cuivre au niveau hépatique. Les mécanismes exacts entraînant la mort des hépatocytes dans l'atteinte hépatique demeurent par contre des sujets primordiaux dont il est important de débattre. En effet, la nécrose et l'apoptose teignent le phénomène de mort cellulaire de manière bien différente. Alors que la nécrose présente une évolution plus anarchique découlant d'un ordre d'événements plus aléatoires, l'organisation séquentielle de l'apoptose offre un tableau plus structuré impliquant des acteurs qu'il est possible d'identifier et de quantifier. Les interactions moléculaires permettant d'envisager une modulation ou un arrêt de ce phénomène sont ainsi plus faciles à reconnaître et à exploiter.

Au niveau hépatique comme dans bien d'autres tissus du corps humain, la mort cellulaire peut survenir par les deux mécanismes. D'ailleurs, l'apoptose et la nécrose surviennent presque toujours de pair dans un tissu initialement sain. L'implication relative de chaque mécanisme de mort cellulaire peut cependant varier considérablement[116]. La nature, l'acuité et l'intensité de l'agression seront tous des facteurs qui moduleront la réponse d'un hépatocyte à un agresseur potentiellement mortel.

Strand et al. ont été parmi les premiers à démontrer que l'apoptose était impliquée dans la mort des hépatocytes atteints de la maladie de Wilson. Cette étude a poussé plus loin la caractérisation du phénomène en démontrant une augmentation de l'expression du récepteur de mort Fas et de son ligand, ainsi que du gène suppresseur de tumeur p53.[182]

Ce travail constituait en quelque sorte l'étape initiale du processus scientifique dans ce domaine, prouvant l'implication de l'apoptose au sein des hépatocytes atteints de la maladie de Wilson. Mais cette recherche ne répondait qu'à la première des questions

concernant les mécanismes de mort cellulaire chez ces hépatocytes. Elle laissait en plan tout le mécanisme intracellulaire permettant la propagation du signal apoptotique. Cette question est particulièrement importante au sein des hépatocytes. En ce qui a trait à l'apoptose, les hépatocytes sont des cellules de type II, c'est-à-dire qu'elles font partie des cellules s'appuyant sur la voie mitochondriale pour amplifier le signal apoptotique.

De plus, il est important de remarquer qu'une portion significative des travaux de ce groupe de recherche ont été principalement réalisés à l'aide d'un modèle *in vitro*. Les coupes histologiques provenaient de foies prélevés lors de greffes chez des patients atteints de la maladie de Wilson. Mais le modèle cellulaire de surcharge de cuivre était basé sur des cellules d'hépatome humain de la lignée HepG2 exposées à un médium aux fortes concentrations de cuivre. Bien qu'il s'apparente à la maladie de Wilson, ce modèle ne constitue pas la représentation la plus fidèle de la réalité intracellulaire des hépatocytes atteints de la maladie. Les cellules HepG2 disposent d'un arsenal génétique et protéique adéquat pour faire face à la surcharge en cuivre.

En revanche, le rat LEC est un modèle extrêmement fidèle de la physiologie hépatique perturbée des patients atteints de la maladie de Wilson. En ce qui a trait à l'évolution hépatique de la maladie, le rat LEC démontre un tableau clinique et biochimique tout à fait correspondant à celui des patients. Les données génétiques viennent fortement corroborer ces observations. L'utilisation de ce modèle animal dans les études subséquentes ajouterait un plus grand potentiel d'extrapolation des données recueillies.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'apoptose chez le rat LEC[176-178, 180, 181]. Parmi elles, l'étude de Kato et son équipe a abordé le problème en se questionnant sur l'impact du fer alimentaire sur l'apoptose hépatique. On compara l'évolution d'une cohorte de rats LEC alimentés avec une diète faible en fer à l'évolution d'une seconde cohorte de rats LEC nourris avec une diète régulière. À la lumière des résultats de leur étude, les auteurs arrivèrent à une conclusion qui divergeait des notions établies sur le sujet. Selon eux, le fer serait le principal agent responsable de l'hépatite fulminante chez le rat LEC et, par extension, le principal agent responsable de l'apoptose d'hépatocytes. Le cuivre jouerait un rôle indirect dans ce phénomène

physiopathologique. Son accumulation serait à l'origine d'une réaction hémolytique qui libèrerait une quantité importante de fer en circulation. C'est suite à la saturation des capacités de tamponnage de la ferritine que se développeraient des radicaux libres et, subséquemment, des dommages hépatiques.

Puisque l'étude de Kato *et al.* portait sur des animaux dont l'apport en fer avait été modulé, une étude qui isolerait spécifiquement le cuivre dans la diète des rats LEC permettrait de définir davantage l'implication respective des deux métaux. Cette nouvelle étude pourrait également contribuer à confirmer ou infirmer les conclusions du groupe de Kato. De plus, les mécanismes intracellulaires entraînant l'apoptose d'un grand nombre d'hépatocytes méritaient d'être étudiés davantage afin d'en identifier les acteurs et leurs interactions.

Le but de cette étude était donc d'étudier l'impact du cuivre alimentaire sur l'apoptose et sur l'expression de gènes pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au sein des hépatocytes chez le rat LEC.

Article

Apoptosis in Long-Evans Cinnamon rat hepatocytes involves Bcl-2 family genes

Alexis-Simon Cloutier¹, Seon Mee Park², Réginald Renous¹, Marianne Beaudin¹, Steven R. Martin², Fernando Alvarez², Michel Lallier¹

¹Department of Surgery, ²Department of Pediatrics, Hôpital Ste-Justine ,
Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

Correspondance to : Dr Michel Lallier, Department of Surgery

Hôpital Sainte-Justine, 3175, Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5. Tel: [information retirée / information withdrawn]

E mail: [information retirée / information withdrawn]

Abstract:

Introduction : Wilson's disease (WD) is an autosomal recessively inherited disorder caused by a mutation in the *ATP7B* gene. The LEC rat is an animal model of WD that suffers spontaneous hepatitis. Copper accumulation in the liver of these rats stimulates the production of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress. Yet, the respective involvement of copper and iron in this insult remains unclear, while the mechanism by which hepatocytes die remains only partly explained.

Goal : To prove that copper is the main ion responsible for apoptosis in LEC rat hepatocyte and evaluate Bcl-2 family gene expression which are possibly mediating this process.

Method : Four groups of male LEC rats were fed diets containing different concentrations of iron and copper. Hepatic iron and copper concentrations were measured. Apoptosis was evaluated on histological slides by TUNEL staining, while RT-PCR was performed to quantify the expression of Bcl-2 family genes.

Results : Rats receiving a copper-enhanced diet developed fulminant hepatitis and showed significantly more apoptotic cells. A direct correlation was observed between the concentration of liver copper and the rise in pro-apoptotic gene Bad expression. Expression of anti-apoptotic Bcl-2 followed the same expression trend as Bad, but with lower intensity. In the copper-enhanced diet group, the relative expression of Bad and Bcl-2 favored the pro-apoptotic gene. Bak and Bax gene expressions in the liver were not significantly influenced by accumulation of copper or iron.

Conclusions : Apoptosis is involved in the pathogenesis of fulminant hepatitis in the LEC rat. The pro-apoptotic profile of gene expression established between Bad and Bcl-2 gene strongly suggest the involvement of these proteins in the mechanism leading to hepatocyte apoptosis.

Key words : Apoptosis, Bcl-2, Bad, hepatocytes, LEC rat, Wilson's Disease, copper, iron

INTRODUCTION

Copper is an essential element in most living organisms as it is incorporated in a variety of proteins(1). Since daily intake surpasses greatly the body's requirement, the delicate homeostasis of this metal has to be precisely maintained by an adequate excretion system. Copper accumulation stimulates the production of reactive oxygen species (ROS) including hydroxyl radicals and Cu^+ -peroxyde complexes (2). These oxidants have severe toxic effects on cells by causing injuries to macromolecules including DNA. Wilson's disease (WD) is an ideal example of this toxic condition. This autosomal recessively inherited disorder is caused by a mutation in the *ATP7B* gene located on chromosome 13q14.3(3). The P-type copper transporting ATPase protein transcribed from this gene is expressed in the liver, the kidneys, brain and placenta(4). The abnormal protein yielded by the mutated gene impairs the incorporation of copper into ceruloplasmin (the main copper-binding protein found in plasma) and the biliary excretion of copper(5, 6). This deficit induces copper accumulation in the liver, the brain, the eyes and the kidneys. Ceruloplasmin oxidase activity is also reduced in WD patients(7). In children, liver disease is the most common presenting feature, while patients in their second decade or more may present with neuro-psychiatric symptoms. Most patients with WD, whatever their clinical presentation, have some degree of liver disease(8). The hepatic impairment covers a wide variety of phenotypes ranging from asymptomatic minor biochemical disturbances or hepatomegaly to severe fulminant hepatic failure(9).

The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is an excellent animal model for WD. It presents a 900 bp deletion in the C-terminal portion of the *atp7b* gene(10). This gene shares 87% homology with the human WD gene(11). Like WD patients, the LEC rat has reduced or absent ceruloplasmin

oxidase activity and lacks adequate copper transport and proper biliary excretion. The latter deficit results in accumulation of both copper and iron in the liver. Forty percent of LEC rats die from fulminant hepatitis between the age of 16 and 20 weeks(12). Previous studies have shown that copper generates hydroxyl radicals in LEC rat livers(13, 14). It was also shown that copper accumulation in the liver of LEC rats induces DNA strand breaks, while accumulation of iron does not(15).

Whether the WD hepatic insult is chronic or fulminant, the actual mechanism by which hepatocytes die needs further characterization. Strand et al. have demonstrated the involvement of apoptosis in hepatocyte death in WD(16). P53 and the Fas and Fas-L complex were identified as the main proteins leading to hepatocyte suicide. The apoptotic phenomenon in the LEC rat hepatocytes has also been demonstrated by several publications(17-22). The relative involvement of copper and iron in inducing apoptosis in this model is still a matter of debate. Work published about the role of iron by Kato et al.(21) and by Sugawara et al.(29) came to opposing conclusions on the impact of iron deprivation in LEC rat. As for copper, no study has yet evaluated the impact of modulating dietary copper on apoptosis. Moreover, the intracellular mechanism transforming pro-apoptotic stimuli into hepatocyte apoptosis was not identified. Studies on apoptosis, in which cells were classified according to the principal pathway used to achieve apoptosis, recognized hepatocytes as type II cells, which depend mainly on the mitochondrial (intrinsic) pathway, as opposed to type I cells which need the death-receptor (extrinsic) pathway(23, 24).

Thus, the aim of our study was to evaluate the impact of dietary copper on apoptosis and on the expression of pro and anti-apoptotic Bcl-2 family genes in the LEC rat hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS

Animals selection and care

We established a colony of LEC rats (Charles River, Yokohama, Kanagawa, Japan) in 1996 to pursue studies of Wilson's disease and therapy of metabolic liver disease. Initially, expansion of the colony was hindered by recurrent neonatal deaths. LEC rats were crossed with Long Evans (LE) rats (Charles River, St-Constant, Canada) and by backcrossing (LEC x LE) heterozygotes to LEC rats, the LEC mutation was retained in stronger offspring.

44 male homozygote LEC rats were included in the study. Homozygotes were selected by RT-PCR. Tissue was harvested from the tip of the tail at 4 weeks. The RT-PCR primers and conditions for *ATP7B* were as follows; PE21 5'-GGC ATG ACT TGT CAT TCT TG-3' (forward), PE22 5'-GAT CTT GCC TTC GAT GGA G-3' (reverse) primers were used to amplify a 300 nucleotide sequence of exon 2 present in all rats and PE181 5'-GGC ATC AAC AAA GTC TTT GC-3'(forward), PE182 5'-CTT ATA AGG ACC ACG TCG G-3' (reverse) to amplify a 200 nucleotide sequence of exon 18 which lies within the deleted region in LEC rats and therefore is only present in normal rats. PCR involved 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 54°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds. The committee for Animal Care in Research of Sainte-Justine Hospital approved the use of animals and their care. The care and treatment of animal followed the guidelines outlined in the NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (revised 1985) prepared by the National Academy of Sciences.

Diet manipulation

The 44 LEC rats included in the study were weaned at 4 weeks and separated into four groups at the age of 5 weeks. Animal groups differed with respect to the iron and copper

concentration of their respective diet. The first group (*Cu +, Fe +*) was provided a standard laboratory chow containing 15.21mg of copper and 226.00mg of iron per kilogram. This group could therefore be considered as a “*normal LEC rat evolution*” group. The second group (*Cu -, Fe -*) was fed a chow lacking copper and iron. The third group (*Cu +, Fe-*) fed on an iron-free diet containing 6.0mg Cu/Kg. Animals from these three groups had access to tap water *ad libitum*. The copper content of this water was considered low, with a concentration of 0.0825ppm. The fourth group (*Cu ++, Fe -*) was fed an iron-free, copper-free diet, but normal tap water was changed for copper-supplemented water. This solution was made of 0.125% cupric acetate monohydrate in distilled water(25). All chows were prepared by Harlan Teklad company (Madison, WI). Rats were sacrificed at the age of 10 weeks or when they started to show signs of developing fulminant hepatitis (weight loss, jaundice, low food consumption, oliguria, dehydration). A daily global overview of the study animals was performed in order to notice the appearance of any new symptoms.

Hepatic Tissue Sampling

Rats were sacrificed using inhaled Isoflurane anesthesia. The liver was removed and random sections were preserved in 4% formaldehyde or in liquid nitrogen for subsequent storage at -80°C after the procedure. Paraffin-embedded slides were prepared for further histological analysis, namely TUNEL staining

Hepatic Copper and Iron concentration

Liver, after digestion with nitric and perchloric acid, (2.5:1, v/v) was analyzed for copper and iron concentrations by atomic absorption spectrophotometry (Hitachi, Schaumburg, IL)(26). The concentration of copper and iron in liver was expressed as $\mu\text{mol/g}$ dry weight.

TUNEL staining

Apoptosis was evaluated by light microscopic analysis of terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin (dUTP) nick-end labelling (TUNEL)-stained liver sections. The staining was performed using the Apoptag® peroxidase *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon International, Temecula, CA). Slides were deparaffinated with xylene before performing the TUNEL staining. After peroxidase reaction, specimens were counterstained with 0.5% (w:v) Methyl green. TUNEL-positive cells were counted by randomly selecting 5 high-power fields (hpf) (X400).

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Whole tissue processing was performed in triplicate on three different samples for every rat. All three extractions were processed as different samples. Average expression was calculated after RT-PCR analysis of the three samples and considered as the final value.

mRNA isolation

mRNA extraction was performed using TRIzol LS Reagent™ (Quiagen, Mississauga, Ont., Canada). Hepatic tissue preserved at -80°C was shredded with a scalpel. 50mg of hepatic tissue was homogenized in 0.75ml of TRIzol LS. Homogenates were allowed to react at room temperature for 5 min; 0.2ml of chloroform was then added followed by incubation for 10 minutes at room temperature. The samples were centrifuged at 12,000 x g for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and mRNA was precipitated using 0.5ml of isopropyl alcohol. Samples remained at room temperature for 10 minutes and were then centrifuged at 12000 x g for 10 minutes at 4°C. The resultant mRNA pellet was washed with ice cold 75% ethanol in diethylpyrocarbonate(DEPC)-treated water and centrifuged at 4°C at a speed

of 7500g for 5 minutes. Supernatant was dismissed and pellets were finally resuspended in DEPC water.

cDNA synthesis

Synthesis of first-strand cDNA was carried out using the Superscript™ II Reverse Transcriptase protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA). 500ng of total mRNA was added to dNTP mix, oligo dT and random hexamer primers, and the SuperScript enzyme. Single strand cDNA was obtained and kept at -20°C.

Semi-quantitative PCR

All four Bcl-2 family genes (Bad, Bak, Bax and Bcl-2) were amplified by first round of PCR using single strand cDNA. The primers used for all Bcl-2 family genes were those published by Masson et al.(27) Each round of PCR was performed under the following conditions: for Bcl-2, initial denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 37 cycles of 94°C for 30s, 58°C for 60s, 72°C for 60s and final extension at 72°C for 3 minutes; for Bad, Bak and Bax, initial denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 37 cycles of 94°C for 30s, 60°C for 60s, 72°C for 60s and final extension at 72°C for 3 minutes. β -actin primers were included in every reaction as internal controls. A 195 bp β -actin segment was amplified using 5' –AGG CAT ACA GGG ACA ACA C-3' (forward), 5' –GGA GAA GTT TGG CAC CAC-3' (reverse).

Quantification was performed using Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Electrophoregrams were generated and analysed by Agilent 2100 expert software. The area under the curve of the peaks representing the expression of the gene of interest and the

β -actin expression were both calculated. A ratio of the two areas under the curve was calculated to evaluate the relative expression of the studied gene.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the ANOVA test for continuous variables to evaluate differences between the four different dietary groups. Once statistical significance was confirmed with the ANOVA test, pairwise comparison of each possible pair of groups was performed using post-hoc Scheffé's test, which corrects for multiple comparisons. The level of significance was taken as $P < 0.05$. All results are expressed as mean \pm standard deviation. Every analysis was performed using Analyse-it® statistical software (Analyse-It Software, Ltd., Leeds, England).

RESULTS

Clinical course

Rats were included in the four dietary groups at a mean age of 36 days. As expected in a short term study of young rats, all 31 rats included in the three groups fed either a regular lab diet ($Cu +, Fe +$) (the "normal LEC rat evolution" group) or a diet depleted in iron and/or copper ($Cu -, Fe - ; Cu +, Fe -$) survived until the end of the study without any symptoms of hepatitis (weight loss, icterus, difficulty feeding). The rats from these three groups were sacrificed after an average of 33.7 days feeding on their respective diet. On the other hand, the rats fed the copper-

enhanced, iron deficient diet (Cu^{++} , Fe^{-}) all became symptomatic. The symptoms appeared between the 9th and 17th day of exposure to this specific diet. In this group, the mean symptom free survival was 12.8 days. The onset of hepatitis was very sudden and evolved rapidly. Five of 13 rats died from fulminant hepatitis before they could be sacrificed. The liver of these animals could therefore not be included for further analysis. Ascites was found in the abdomen of the 8 other rats from this group. Their livers were particularly small and dark coloured.

Hepatic copper concentration

The copper concentration of the liver varied directly with the dietary copper concentration. (Figure 1) The (Cu^{++} , Fe^{-}) rats accumulated significantly more than any other group in this study ($P < 0.0001$). The average of 28.83 ± 6.44 uMol copper/g dry weight liver is almost 4 times the quantity retained by “normal LEC rat evolution” rats which was, in turn, significantly higher than that found in (Cu^{-} , Fe^{-}) group ($P < 0.0001$). The (Cu^{+} , Fe^{-}) group presented a hepatic copper concentration that was not significantly different from the (Cu^{-} , Fe^{-}) and the “normal LEC rat evolution” groups. However, there was a trend towards greater accumulation of liver copper in “normal LEC rat evolution” rats (4.96 ± 1.03 uMol/g (Cu^{+} , Fe^{-}), vs 7.45 ± 1.59 uMol/g (Cu^{+} , Fe^{+}) suggesting a potential effect of iron on copper accumulation.

Hepatic iron concentration

Hepatic iron accumulation was compared between the four dietary groups (Figure 2). The only animals receiving iron were the rats in the “normal LEC rat evolution” (Cu^{+} , Fe^{+}) group. Even though they did not receive any dietary iron, the (Cu^{++} , Fe^{-}) rats accumulated significantly more hepatic iron (19.79 ± 9.54 uMol/g) than the animals from the three other groups. As

expected, the “*normal LEC rat evolution*” group accumulated significantly more iron than the (*Cu* -, *Fe* -) and the (*Cu* +, *Fe* -) groups (9.44 ± 2.47 uMol/g (*Cu* +, *Fe* +); 2.50 ± 0.84 uMol/g (*Cu* -, *Fe* -); 2.13 ± 0.61 uMol/g (*Cu* +, *Fe* -)) ($P < 0.05$). The statistical comparison between the (*Cu* +, *Fe* -) and the (*Cu* -, *Fe* -) groups did not reveal any statistically significant difference.

TUNEL staining

The presence of apoptosis in the liver of LEC rats was confirmed by the analysis of the TUNEL stained liver sections (Figures 3 and 4). Apoptotic cells were found in 38/39 rats. The greatest number of apoptotic cells were observed in the (*Cu* ++, *Fe* -) animals with an average of 59.6 ± 58.3 cells/5hpf. All the other groups presented a significantly lower average of apoptotic cells ((*Cu* +, *Fe* +) : 4.0 ± 2.9 cells/5hpf; (*Cu* +, *Fe* -) : 9.3 ± 15.1) ; (*Cu* -, *Fe* -) : 5.6 ± 1.7 cells/5hpf)

Bcl-2 family gene expression

The impact of dietary copper and iron modifications on the expression of the Bcl-2, Bad, Bak and Bax were evaluated by RT-PCR analysis using β -actin gene expression as an internal control (Figure 5). The expression of Bad was significantly higher in the (*Cu* ++, *Fe* -) group compared with any of the three other groups ($P < 0.0001$). Among the (*Cu* -, *Fe* -), (*Cu* +, *Fe* -) and the “*normal LEC rat evolution*” groups there was a trend towards increased hepatocyte expression with the degree of copper supplementation. Expression of Bad was the lowest in the (*Cu* -, *Fe* -) group, followed by the (*Cu* +, *Fe* -) group. The expression of Bad in the two latter groups was lower still than the expression measured in the “*normal LEC rat evolution*” group.

The expression of Bcl-2 was only slightly influenced by the dietary modifications in the four groups. No statistically significant differences in Bcl-2 expression in the liver was observed between the four dietary groups. However, again there was a trend towards increased Bcl-2 expression with increased copper intake ($(Cu^{++}, Fe^{-}) > (Cu^{+}, Fe^{+}) > (Cu^{+}, Fe^{-}) > (Cu^{-}, Fe^{-})$).

As shown in figure 6, Bax gene expression in rat liver was not influenced by dietary copper or iron supplementation in the LEC rat. The data analysis indicated a significant difference in Bax expression between the (Cu^{++}, Fe^{-}) and the “normal LEC rat evolution group” (Cu^{+}, Fe^{+}) ($P=0.035$). However no trend could be observed in correlation with neither the iron nor the copper in the liver. Increasing the size of the study groups would probably level out this difference. On the other hand expression of Bak correlated with increasing iron intake. (Cu^{+}, Fe^{+}) rats over-expressed Bak compared to (Cu^{+}, Fe^{-}) rats ($P=0.011$). However, Bak expression did not correlate with the hepatic concentration of iron.

DISCUSSION

In the first study demonstrating the involvement of apoptosis in the death of hepatocytes in Wilson Disease patients, Strand et al. focused their analysis on the expression of CD95 (APO-1/Fas) and its ligand, CD95-L. CD 95 is constitutively expressed in normal hepatocytes(28).

In the current literature, two principal apoptotic pathways have been described. The extrinsic pathway relies on the activation of death receptors and the caspase cascade to trigger apoptosis. In the intrinsic pathway the fate of the cell depends on the balance between pro and anti-apoptotic proteins on the mitochondrial membrane. The two pathways are therefore referred to as the

death-receptor and the mitochondrial pathway, respectively. The pathway used by a specific cell to induce its programmed death depends on the nature of the cell. The type I cells use preferentially the extrinsic pathway, while type II cells rely on the intrinsic pathway. Hepatocytes are type II cells(23, 24).

The Bcl-2 family proteins are the main actors in the process of mitochondrial apoptosis. They all express at least one of the four Bcl-2 Homology (BH) domains (BH1 to BH4). Two major subgroups have been characterized within this family: pro and anti-apoptotic members. Bak and Bax belong to the pro-apoptotic subfamily, while Bcl-2 is the main anti-apoptotic protein. Bad is also a pro-apoptotic Bcl-2 family protein, but it has the special characteristic of being the only one of the four proteins in this study to express only the BH3 domain. Bcl-2, Bak and Bax are found integrated in the mitochondrial membrane. Bak and Bax may dimerize and form transmembranous pores. Bcl-2 anti-apoptotic property is derived from sequestering Bak and Bax and preventing pore formation. Like most BH3-only subfamily members, Bad is a cytosolic protein. Its pro-apoptotic action is related to binding and inactivating Bcl-2, releasing Bak and Bax to form transmembrane pores to enable release of cytochrome c from the intermembrane space which initiates apoptosis.

Apoptosis in the LEC rat has been confirmed by different groups (17-20, 22), but intracellular mechanism leading to programmed cell death has been left unexplained. Work from Klein et al. has identified over-expressed genes in different stages of hepatitis(20). Among many others, apoptosis related genes Bcl-2, Fas and Caspase 3 were found to have an elevated rate of translation.

Our results show a strong over-expression of Bad in the hepatocytes of LEC rats fed with a copper-enhanced diet. Bcl-2 expression also increases but to a lesser degree. When the expressions of these two genes are compared (figure 5), the mitochondrial balance shifts in favor of apoptosis. On the other hand, copper and iron hepatic accumulation did not influence Bak and Bax expression. This does not necessarily rule out a role for Bak and Bax in this process. Possibly, over-expression of Bad leads to more Bad-Bcl-2 interaction, therefore freeing Bak and Bax from the Bcl-2 sequestration. Bak and Bax could freely form a pore in the mitochondrial outer-membrane and trigger apoptosis. Further studies would be needed to support this hypothesis.

The positive correlation between Bak expression in the liver and iron intake was surprising, as no literature supporting this observation was found. Moreover, no relations could be observed between Bak expression and the hepatic iron content. A study focused on this issue could help clarify this result.

The relative importance of apoptosis compared to necrosis is still unknown. While the copper concentration used in this study was initially designed to induce copper overload in normal rats, copper supplemented LEC rats readily developed severe hepatic injury. A similar study with varying dietary copper concentrations could help refine the protocol to identify the conditions in which apoptosis is maximal.

The respective roles played by copper and iron in LEC rat hepatitis is controversial. In this study, we demonstrate that isolated dietary copper overload can induce apoptosis as one of the molecular mechanisms leading to hepatocyte death in fulminant hepatitis in the LEC rat. Iron was initially withdrawn from the diet of every group except the “*normal LEC rat evolution*” (Cu^+ , Fe

+) group to isolate the effect of copper in the hepatocytes. In this study only LEC rats ingesting copper supplemented diet (*Cu* ++, *Fe* -) developed fulminant hepatitis. Animals from the other groups did not show symptoms of fulminant hepatitis and accumulated significantly less iron and copper in their liver. Liver cells in the *Cu* ++, *Fe* - rats accumulated significantly more copper indeed, but also accumulated significantly more iron.

In a previous study, Sugawara et al.(29) hypothesised that an iron deficient diet stimulated copper accumulation in the liver and hepatitis through increased absorption of copper from the gastrointestinal tract. These rats fed copper-sufficient, iron deficient diet developed hepatitis by the 35th day of experiment. Results in the present study were different, as only copper supplemented (*Cu* ++, *Fe* -) rats developed hepatitis within 35 days of treatment. All other rats were healthy. This could be explained in part by the 40% difference in diet copper content between the two studies (6.0mg Cu/Kg (*Cu* +, *Fe* -) vs 10mg Cu/Kg copper-sufficient, iron deficient group).

In another study, Kato et al.(21) found iron to be the main culprit and copper an indirect actor in LEC rat hepatocyte apoptosis. They suggested a mechanism by which free copper ions could induce hemolytic anemia therefore freeing large amounts of iron. This excess iron would lead to reactive oxygen species (ROS) formation and hepatocyte damage.

There is a reason to suppose that hepatic iron accumulation results from copper toxicity. Since rats on copper-supplemented diet were fed an iron deficient chow, the iron accumulated in the liver had to come from another source than dietary intake. Fulminant hepatitis in WD and in the LEC rat is frequently associated with free copper induced hemolysis. Iron is liberated and

consequent increased iron load must be taken up and oxidized prior to release from the liver bound to the iron transport protein transferrin.

The cuproenzyme ceruloplasmin has an important ferroxidase activity. It is synthesized in the liver and secreted in the plasma, it functions to oxidize iron, allowing it to bind to transferrin and leave the hepatocyte. The iron uptake system is functional in LEC rat hepatocytes, but ceruloplasmin oxidase activity is absent in a majority of animals due to the lack of copper incorporation into the enzyme via mutated ATP7B gene product. With hemolysis, increased iron would be transported into the hepatocytes, but could not be released and the subsequent accumulation induces liver injury. The LEC rat therefore develops liver injury initially from copper toxicity and secondarily through iron toxicity.

The capacity of iron to produce hydroxyl radicals through Fenton reaction and produce DNA damages has been well described although copper may be more potent in this respect(2)

Copper accumulation induces ROS that lead to lipid peroxidation and DNA damage through primary and secondary mechanisms. Such DNA alterations are sensed by the cell which undergoes apoptosis. This induction of apoptosis may be well initiated via the tumor-suppressing protein p53. Strand et al.(16) showed that p53 expression is modified in an *in vitro* system in which HepG2 cells were exposed to high concentrations of copper. But even though p53 was proven to increase Bax and Bcl-2 transcription in other models(30, 31), the exact link still needs to be established between DNA alterations and Bad over-expression.

Even though type I and type II cells each have pathway preferences to induce apoptosis, the intrinsic and extrinsic pathways are not completely independent. Based on current knowledge

and the results of this study, we would like to suggest a hypothesis of the molecular mechanism leading to apoptosis in WD. Copper overload would induce ROS accumulation causing lipid peroxidation and DNA damages. These DNA anomalies would cause p53 nuclear accumulation, inducing transcriptional activation of Fas and Bad. Bad would then bind Bcl-2, triggering apoptosis through pore formation by Bak and Bax. Further studies will be necessary to identify the exact players in the apoptosis cascade in WD hepatocytes. This study further emphasizes the role played by apoptosis in hepatic WD, therefore offering potential therapeutic targets for new molecular therapies(32).

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank M. Pascal Lapierre and Mrs Kathy Béland for mentorship and technical support. This work was supported by grants from the Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine and from the department of surgery of the Université de Montréal.

REFERENCES

1. Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology* 1980;78:1615-1628.
2. Oikawa S, Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron(III) and copper(II). *Biochimica et Biophysica Acta* 1998;1399:19-30.
3. Frydman M B-TB, Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, Goldwitch Z. Assignment of the Gene for Wilson's Disease to Chromosome 13 : Linkage to the Esterase D locus. *Procedures of the Natinal Academy of Science of the USA* 1985;82:1819-1821.

4. Bull PC TG, Rommens JM. The Wilson Disease Gene is a Putative Copper Transporting P-Type ATPase Similar to the Menkes Gene. *Nature Genetics* 1993;5.
5. Terada K AN, Yang XL, Iida M, Nakai M, Miura N, Sugiyama T. Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B. *FEBS Letters* 1999;448:53-56.
6. Terada K NT, Yang XL, Iida M, Aiba N, Minamiya Y, Nakai M, Sakaki T, Miura N, Sugiyama T. Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:1815-1820.
7. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration Wilson's disease. *Science* 1952;116:484-485.
8. Ferenci P. Review article : diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2004;19:157-165.
9. Gitlin N. Wilson's disease : the scourge of copper. *Journal of Hepatology* 1998;28:734-739.
10. Muramatsu Y YT, Miura M, Sakai T, Suzuki Y, Serikawa T, Tanzi RE, Matsumoto K. Wilson's Disease Gene is Homologous to hts. *Gastroenterology* 1994;107:1189-1192.
11. Wu J FJ, Chen HS, Cox DW. The LEC rat has a deletion in copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson Disease gene. *Nature Genetics* 1994;7:541-545.
12. Mori M, Hattori A, Sawaki M, Tsuzuki N, Sawada N, Oyamada M, Sugawara N, et al. The LEC rat : a model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *American Journal of Pathology* 1994;144:200-204.
13. Nakamura M, Nakayama K, Shishido N, Yumino K, Ohyama T. Metal-induced hydroxyl radical generation by Cu^+ -Metallothioneins from LEC rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1997;231:549-552.
14. Yamamoto H, Watanabe T, Mizuno H, Endo K, Hosokawa T, Kazusaka A, Gooneratne R, et al. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. *Free Radicals Biology and Medicine* 2001;30:547-554.
15. Hayashi M, Kuge T, Endoh D, Nakayama K, Arikawa J, Takazawa A, Okui T. Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2000;276:174-178.
16. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, et al. Hepatic Failure and Liver Cell Damage in Acute Wilson's Disease Involve CD95 (APO-1/Fas) Mediated Apoptosis. *Nature Medicine* 1998;4:588-593.
17. Yamate J, Kumagai D, Tsujino K, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, et al. Macrophage populations and apoptotic cells in the liver before spontaneous hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. *J Comp Pathol* 1999;120:333-346.

18. Santon A, Sturniolo GC, Albergoni V, Irato P. Metallothionein-1 and metallothionein-2 gene expression and localisation of apoptotic cells in Zn-treated LEC rat liver. *Histochem Cell Biol* 2003;119:301-308.
19. Nair J, Strand S, Frank N, Knauff J, Wesch H, Galle PR, Bartsch H. Apoptosis and age-dependant induction of nuclear and mitochondrial etheno-DNA adducts in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats: enhanced DNA damage by dietary curcumin upon copper accumulation. *Carcinogenesis* 2005;26:1307-1315.
20. Klein D, Lichtmannegger J, Finckh M, Summer KH. Gene expression in the liver of Long-Evans cinnamon rats during the development of hepatitis. *Arch Toxicol* 2003;77:568-575.
21. Kato J, Kobune M, Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamaki S, et al. Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats. *J Clin Invest* 1996;98:923-929.
22. Fong RN, Gonzalez BP, Fuentealba IC, Cherian MG. Role of tumor necrosis factor-alpha in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200:121-130.
23. Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S, Vassalli P. A Bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *Journal of Experimental Medicine* 1996;183:1031-1036.
24. Lacronique V. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Medicine* 1996;2:80-86.
25. Owen CA, Jr., Hazelrig JB. Copper deficiency and copper toxicity in the rat. *American Journal of Physiology* 1968;215:334-338.
26. Schilsky ML SR, Sternlieb I. Copper metabolism in the LEC rats, a rodent model of Wilson's disease. *American Journal of Physiology* 1994;266:G907-G913.
27. Masson S, Scotté M, Garnier S, François A, Hiron M, Ténière P, Fallu J, et al. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis* 2000;5:173-179.
28. Leithauser F, Dhein J, Mechttersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, et al. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Laboratory Investigation* 1993;69:415-429.
29. Sugawara N, Sugawara C. An iron-deficient diet stimulates the onset of the hepatitis due to hepatic copper deposition in the Long-Evans Cinnamon (LEC) rat. *Archives in Toxicology* 1999;73:353-358.
30. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-299.

31. Miyashita T, Krajewski S, M. K, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hofmann B, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805.
32. Eichhorst ST. Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2005;9:83-99.

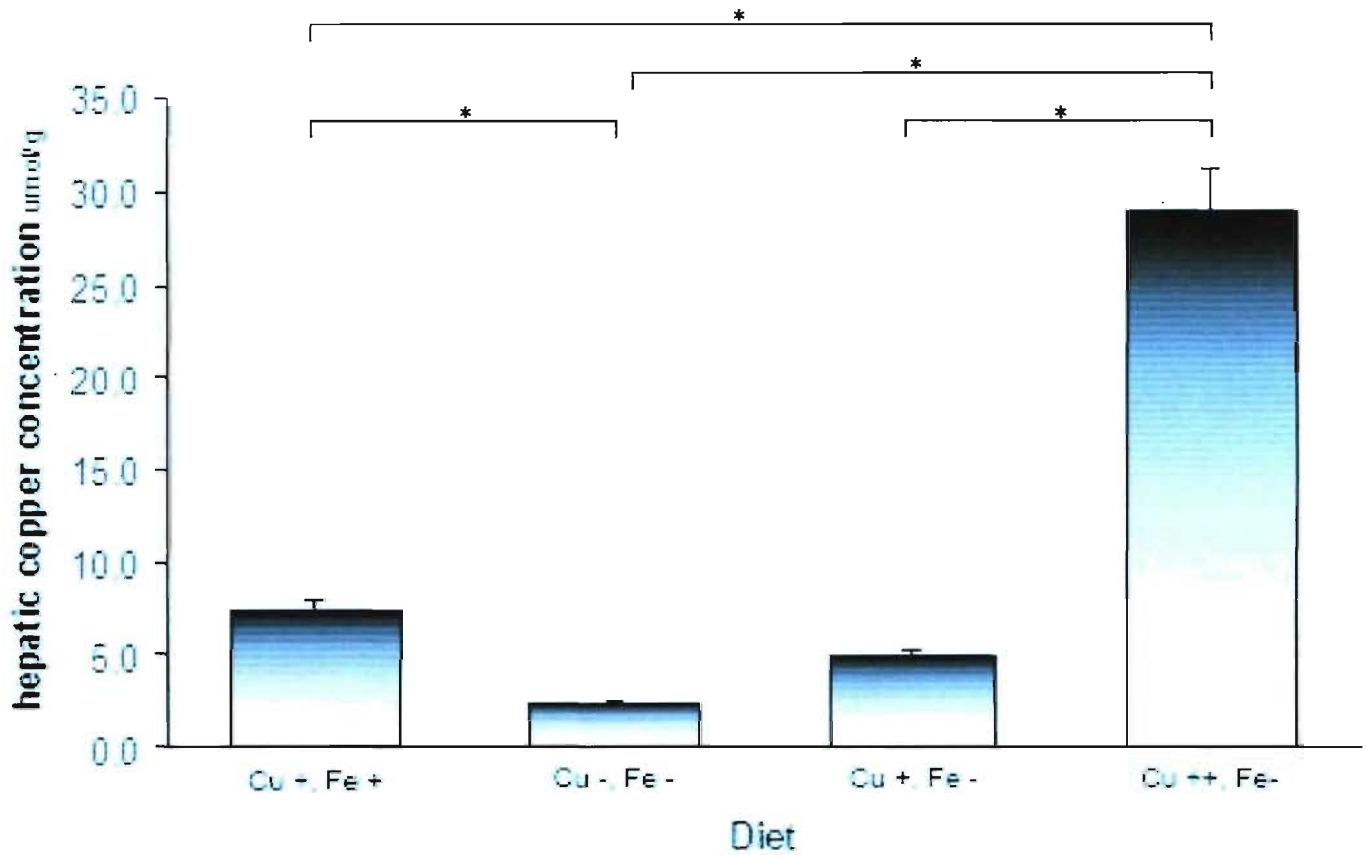


Figure 1 Hepatic copper concentration by dietary group. Results are expressed in uMol/g of dry weight. The copper concentration of the liver varied directly with the dietary copper concentration. The mean value for each group is represented in this chart. Error bars represent the standard error (SE) of the mean values. * $P < 0.001$

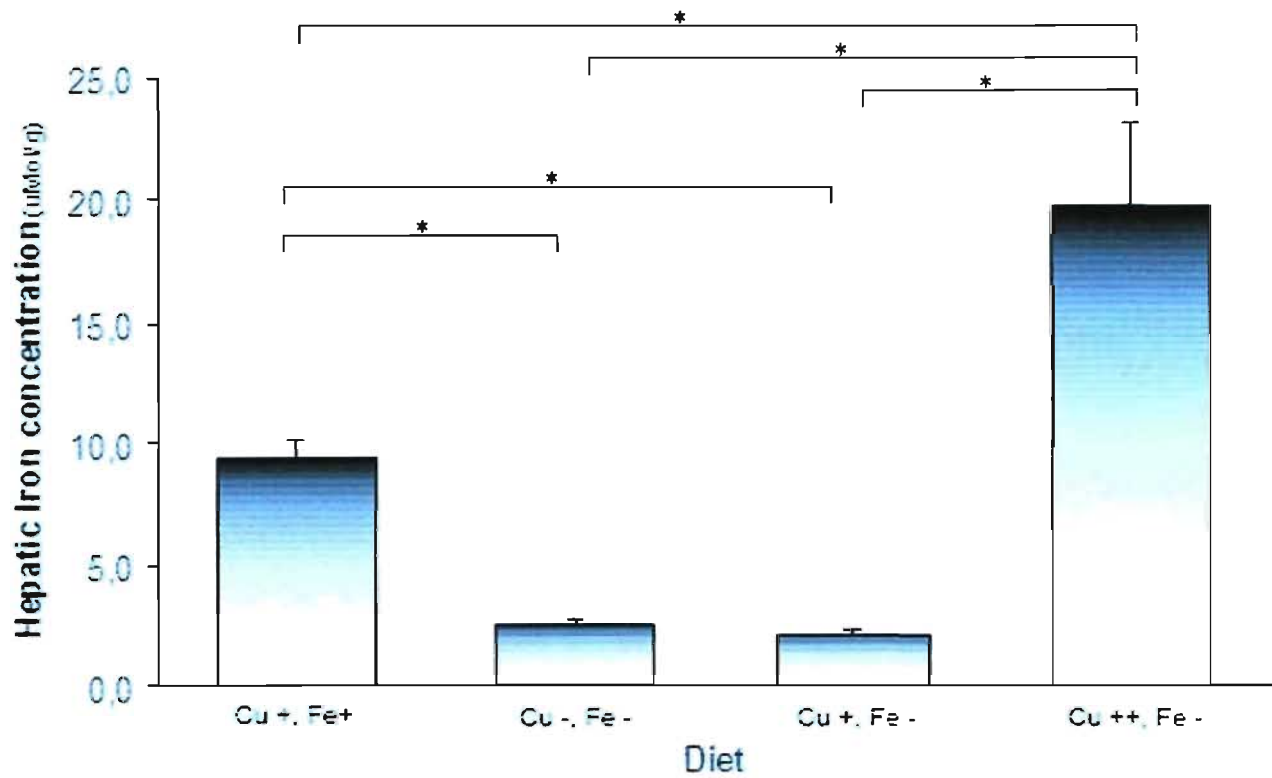


Figure 2 : Hepatic iron concentration by dietary group. Results are expressed in uMol/g of dry weight. The (*Cu ++, Fe -*) rats accumulated the greatest amounts of iron even though these animals were fed iron deficient diet. The mean value for each group is represented in this chart. Error bars represent the standard error (SE) of the mean values. * $P < 0.001$

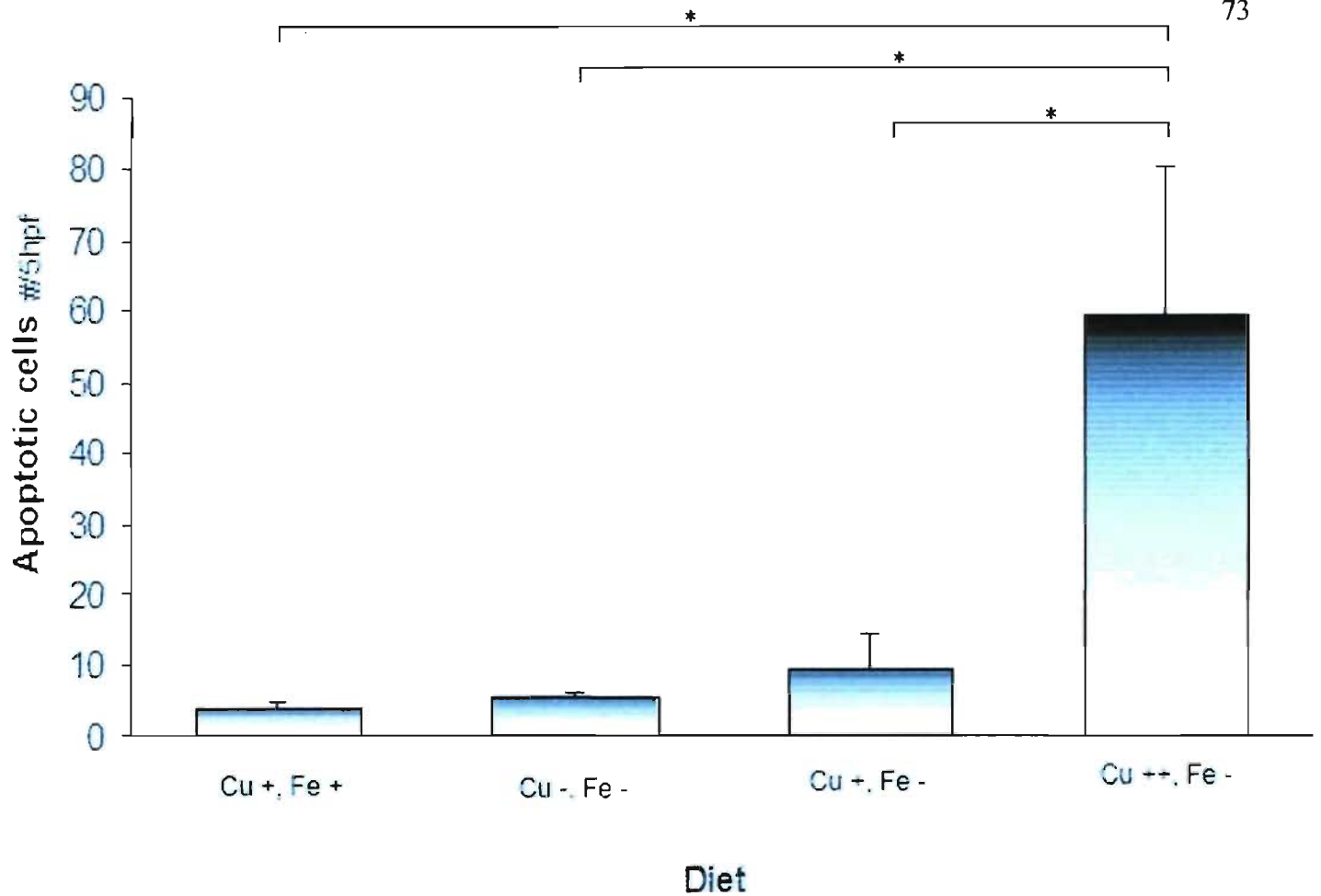


Figure 3 : Number of apoptotic cells by dietary groups. Histological slides of liver tissue were stained using TUNEL technique. Apoptotic cells were counted in five randomly chosen light microscopy high power fields (5hpf; X400). The mean value for each group is represented in this chart. Error bars represent the standard error (SE) of the mean values. $*P < 0.001$

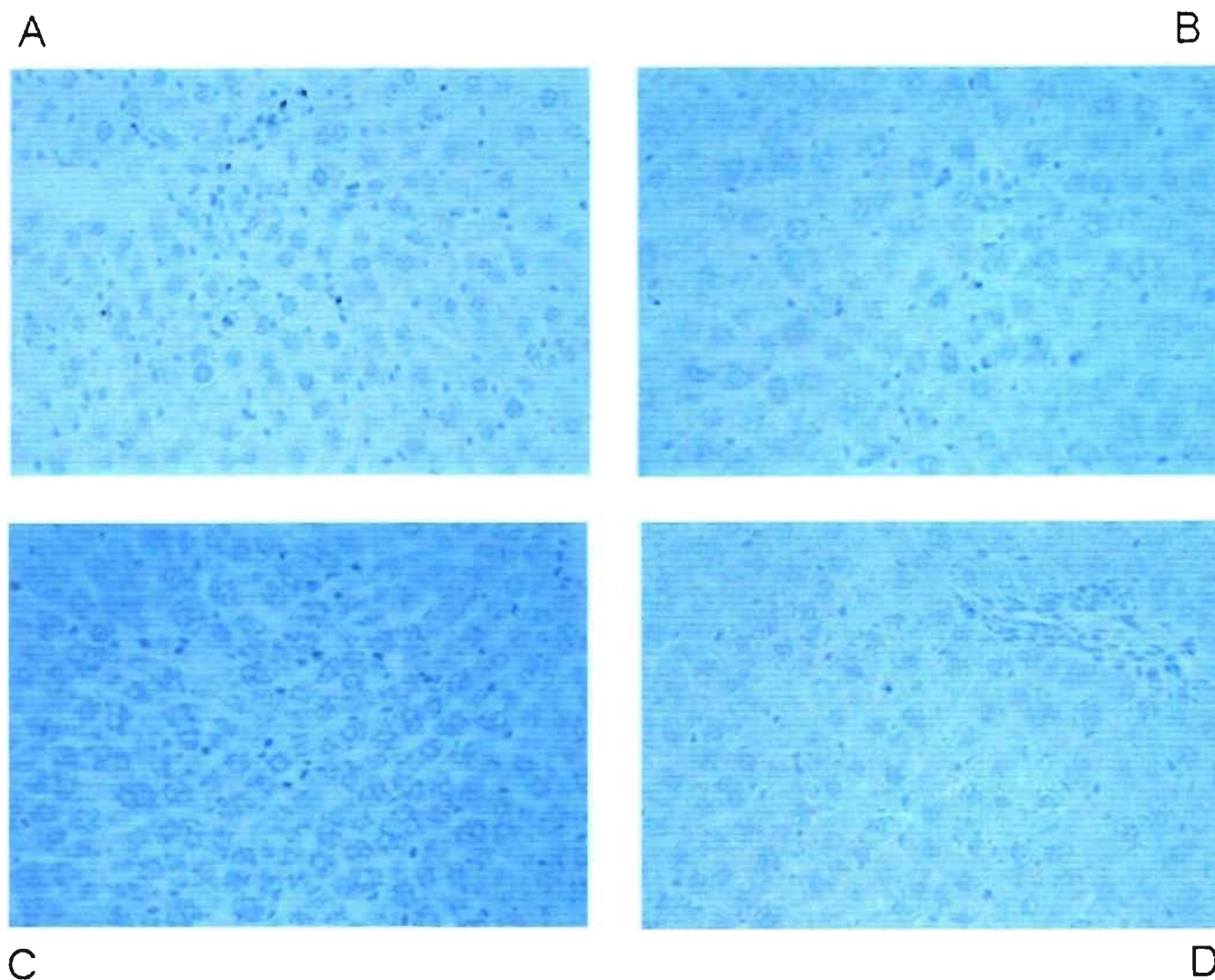


Figure 4 : In situ apoptotic hepatocytes. Liver sections were stained using (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin (dUTP) nick-end labelling (TUNEL) technique. Examples of light microscopy observation are presented for each group : *Cu ++, Fe -*(A); *Cu +, Fe +* (B); *Cu -, Fe -* (C); *Cu +, Fe -* (D). These results are typical of the groups of origin. (original magnification X400)

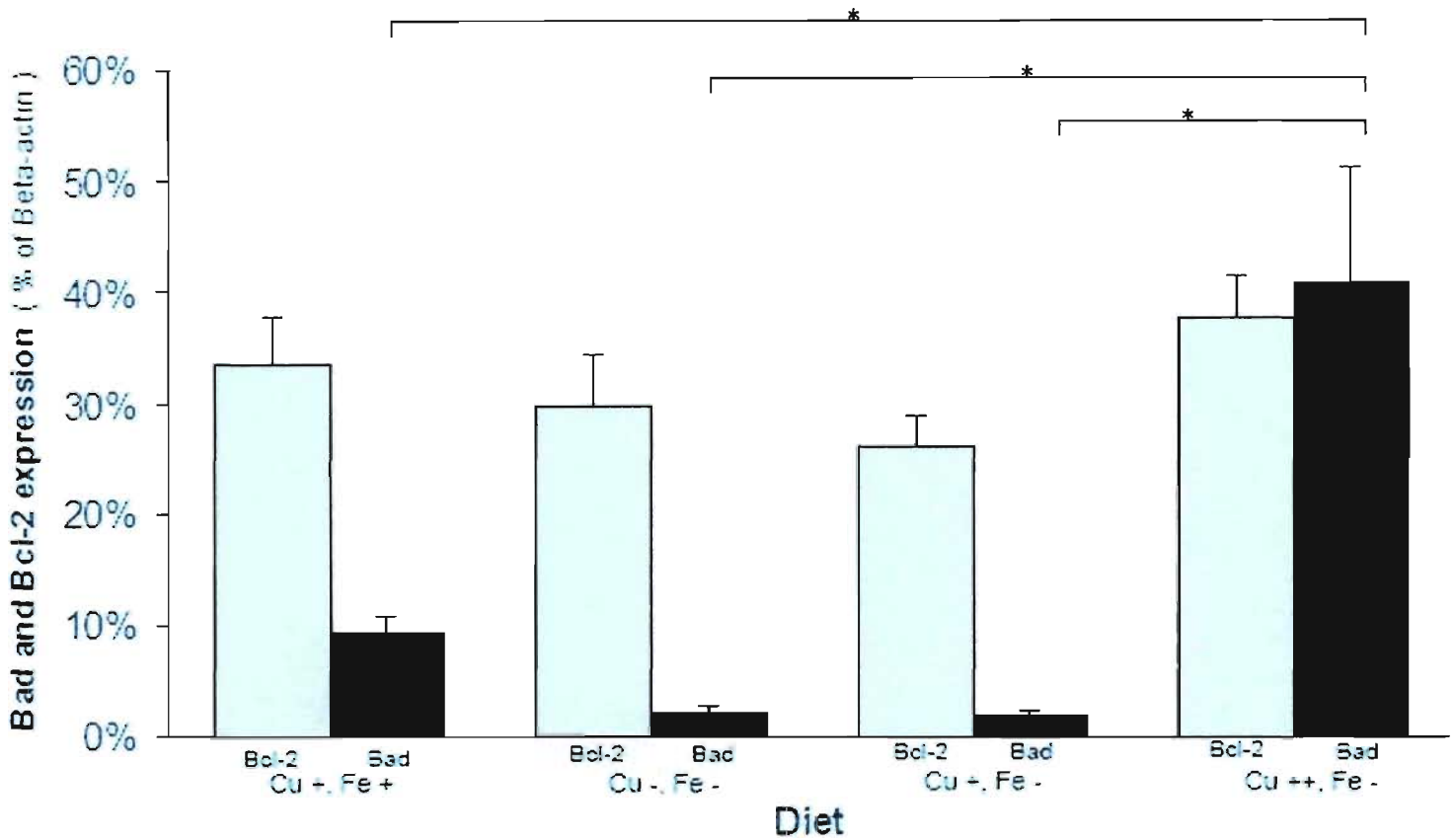


Figure 5 : Comparative expression of pro-apoptotic Bad and anti-apoptotic Bcl-2 in hepatocytes according to dietary group. Results are expressed as ratio of gene/ β -actin gene expression (in %). The relative expression constantly favors Bcl-2 in $(Cu +, Fe +)$, $(Cu -, Fe -)$ and $(Cu +, Fe -)$ groups, resulting in an anti-apoptotic resulting signal. However, this relation is oriented towards a pro-apoptotic signal in the $(Cu ++, Fe -)$ group. The mean value for each group is represented in this chart. Error bars represent the standard error (SE) of the mean values. $*P < 0.001$

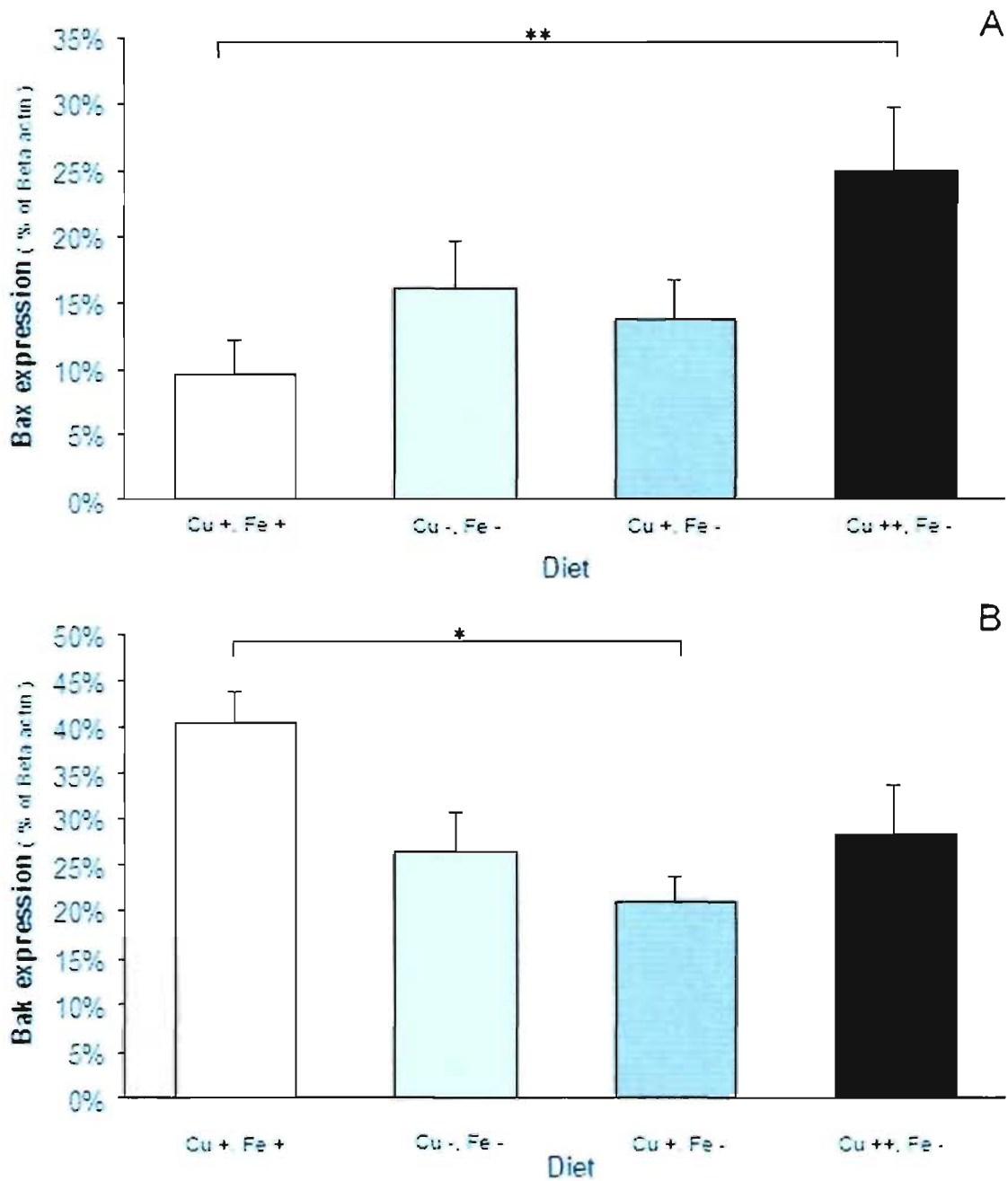


Figure 6 : Expression of pro-apoptotic genes Bax (A) and Bak (B) in hepatocytes by dietary group. Results are expressed as ratio of gene/ β -actin gene expression (in %). No distinct pattern of expression in these two genes. The mean value for each group is represented in this chart. Error bars represent the standard error (SE) of the mean values. * $P=0.011$; ** $P=0.035$

Cette page est inexistante

Discussion et conclusion

Caractérisation supplémentaire du phénomène

Le travail de recherche exposé dans le présent mémoire démontre clairement l'implication de l'apoptose dans la mort des hépatocytes chez les rats LEC atteints d'hépatite fulminante. Cette démonstration vient confirmer les observations faites par Strand et al. sur le modèle *in vitro* et sur les coupes histologiques des patients atteints de la maladie. La correspondance entre les observations faites chez le rat LEC et les données histologiques recueillies chez les patients vient s'ajouter aux arguments reconnaissant cet animal comme modèle fidèle de la maladie de Wilson. Au-delà des déficits génétiques équivalents et des phénotypes cliniques et biochimiques très similaires au niveau hépatique, c'est maintenant au niveau du résultat cytotoxique qu'on démontre une similitude des réactions humaines et animales.

Mais si la présence de l'apoptose dans ce phénomène pathologique ne fait pas de doute, son importance relative demeure inconnue. À ce titre, la technique de TUNEL utilisée dans ce travail de recherche ne représente pas le meilleur outil permettant une fine discrimination des types de mort cellulaire impliqués dans l'hépatite fulminante. Si la sensibilité de cette technique n'est nullement à questionner, les travaux de Grausl-Kraupp *et al.* [179] ont démontré que sa spécificité n'était pas optimale. Une étude visant à quantifier le phénomène apoptotique au sein du foie des rats LEC devrait se baser davantage sur une combinaison de techniques telles la détection par anticorps monoclonaux de souris liant spécifiquement aux brins simples d'ADN et l'analyse et la modulation de l'activité de la caspase 3.

Également, on ne peut traiter de ce aspect du problème sans considérer que l'orientation d'une cellule vers la nécrose ou l'apoptose dépend de plusieurs facteurs. Certains sont extrinsèques à la cellule. On pense par exemple à l'intensité du stimulus cytotoxique, à

la rapidité d'installation de cet environnement délétère ou encore à la nature de l'agent agresseur. D'autres sont intrinsèques à la cellule. L'exemple type de ce genre de facteur est la quantité d'ATP dont dispose la cellule.

Le stimulus utilisé dans les travaux de recherche présentés ici était tiré d'une publication antérieure. Les travaux de Owen et al.[183] visaient à étudier l'effet physiologique d'un déficit ainsi que les effets toxiques d'une surcharge hépatique de cuivre. Les animaux utilisés dans cette étude étaient des rats sains d'une souche autre que les rats LEC. On peut donc présumer que les doses nécessaires pour induire une toxicité étaient de beaucoup supérieures aux doses minimales toxiques chez le rat LEC. L'application de ce protocole pourrait avoir eu comme effet de « sur-intoxiquer » les rats LEC. La progression très rapide des symptômes d'hépatite chez les rats recevant une diète supplémentée en cuivre, et la mort quasi fulgurante de certains d'entre eux témoigne d'ailleurs de cette possibilité.

La violence de cette agression pourrait avoir joué en défaveur du phénomène que nous tentions d'observer. Bien que des cellules apoptotiques aient bel et bien été observées chez les rats recevant une surcharge de cuivre, de nombreuses cellules hépatiques sont sans doute mortes par nécrose.

Le moment choisi pour observer le phénomène doit avoir eu un impact sur la conclusion qu'il est possible d'en tirer. Puisque nos observations ont été réalisées à un seul moment de l'évolution des hépatocytes, notre étude constitue en quelque sorte un cliché pris au moment jugé final. Le choix de ce moment a été dicté par les symptômes cliniques présentés par les rats atteints, certes, mais les symptômes illustrent les conséquences d'une insuffisance hépatique déjà installée. Il serait juste de croire que le moment le plus intense de la souffrance des hépatocytes est déjà passé au moment de l'apparition des symptômes.

Maintenant qu'un premier point de repère a été établi autant au niveau de la concentration de cuivre à administrer que du temps nécessaire à l'installation de

l'atteinte hépatique, il serait intéressant de conduire d'autres études afin de connaître les concentrations idéales favorisant l'apoptose par rapport à la nécrose. De la même manière, des recherches supplémentaires permettraient d'établir le moment de l'évolution toxicologique du phénomène où l'apoptose est à son apogée. Ces données permettraient d'estimer de manière plus juste l'implication relative de l'apoptose dans l'hépatite fulminante chez le rat LEC.

D'un point de vue mécanistique, l'étude exposée dans ce mémoire démontre clairement une surexpression du gène Bad au sein des hépatocytes des rats LEC dans un contexte d'hépatite fulminante. Il est conséquent de croire que cette protéine pro-apoptotique joue un rôle prépondérant dans la propagation du signal apoptotique. Puisqu'ils sont basés sur le reflet de la transcription génique qu'est l'ADN complémentaire, les résultats obtenus ne peuvent témoigner de l'impact fonctionnel que représente cette surexpression génique. Des études protéiques pourraient fournir davantage d'information sur la transposition des modulations géniques en modulation de la physiologie cellulaire. Tout d'abord, des gels de protéine de type Western blot seraient en mesure de quantifier la surexpression réelle de la protéine. L'application d'un anticorps spécifique inhibant la protéine Bad pourrait être appliqué sur des hépatocytes en culture afin d'évaluer l'impact de cette inhibition sur l'apoptose.

Par ailleurs, les preuves apportées du rôle joué par Bad dans la cascade apoptotique chez les hépatocytes n'écarte en rien la possibilité qu'une autre protéine pro-apoptotique joue un rôle significatif dans ce contexte. De la même manière, Bcl-2 ne constitue pas le seul gène anti-apoptotique oeuvrant au niveau des mitochondries des hépatocytes.

Des candidats s'imposent dans les deux camps. D'abord du côté pro-apoptotique, le gène Bid serait certainement un choix intéressant et ce, pour deux types de raison. Premièrement, la protéine Bid a été décrite comme une protéine charnière de l'apoptose au sein des hépatocytes[184]. Deuxièmement, l'étude de la protéine Bid permettrait peut-être de clarifier le lien existant entre les deux mécanismes qui semblent être impliqués dans l'apoptose des hépatocytes.

Tel qu'il a été exposé dans la section sur l'apoptose, les hépatocytes font partie des cellules de type II, utilisant majoritairement la voie mitochondriale pour mener la cellule au suicide. Selon plusieurs auteurs, l'apoptose pourrait être induite par l'activation des récepteurs de mort au niveau membranaire chez les deux types de cellules[137, 185]. La variation du type cellulaire résiderait davantage dans la transmission du signal au niveau intra-cellulaire. Les cellules de type I s'en remettraient à l'activation de la caspase initiateur 8 et des caspases subséquentes impliquées dans la chaîne, alors que c'est la mitochondrie qui propage le signal au sein des cellules de type II. Chez les cellules de type II telles que les hépatocytes, la chaîne de réaction créant le lien entre l'activation du récepteur de mort et le passage de la mitochondrie en mode apoptose est inconnu. Certains auteurs considèrent Bid comme un candidat intéressant pour jouer ce rôle. En effet l'activation de la protéine Bid se fait principalement par l'entremise de la caspase 8.

L'étude de ce phénomène s'inscrirait bien comme étape suivante de la caractérisation de l'apoptose chez l'hépatocyte de la maladie de Wilson. Strand et al. ont démontré une surexpression du récepteur de mort CD95/Fas, alors que notre étude démontre l'implication de protéines mitochondriales dans le phénomène d'apoptose.

Dans la sphère anti-apoptotique, le gène Bcl-X_L serait certes un bon sujet de recherche. Cette protéine occupe sensiblement les mêmes fonctions que son homologue Bcl-2 au sein de la membrane mitochondriale. Quelques rapports déjà démontrent une modulation de son expression chez le rat.

Applications des nouvelles connaissances

Le foie constitue le principal organe responsable de la gestion des substances ingérées et générées par l'activité biologique normale ou pathologique. Parmi les effets toxiques

auxquels les hépatocytes doivent faire face, l'oxydation figure parmi les actions les plus répandues auprès des éléments toxiques rencontrés par le foie. Bien que les hépatocytes soient munis de divers mécanismes de gestion de ces éléments oxydants, une exposition intense, soutenue ou répétée à des substances oxydantes crée presque inévitablement une situation de stress oxydant. Cette condition semble être un des mécanismes physiopathologiques les plus largement impliqués dans les atteintes hépatiques.

Par exemple, l'hépatite alcoolique et son potentiel carcinogène semblent être intrinsèquement liés aux mécanismes d'oxydation. Le métabolisme de l'alcool au niveau hépatique est médié par l'alcool-déshydrogénase. Au cours de ce processus, cette enzyme génère des molécules d'acétaldéhyde et des ERO. Ces deux types de molécules disposent d'un fort potentiel oxydant et s'attaquent aux macromolécules cellulaires, dont les lipides membranaires et l'ADN[186, 187]. De plus, l'acétaldéhyde a pour effet de dépléter les stocks de GSH, inhibant d'autant plus l'arsenal anti-oxydant de la cellule. Par ailleurs, l'exposition chronique des hépatocytes à l'alcool induit la synthèse du cytochrome P450 2E1, ce qui contribue également à la production accrue de radicaux libres.

En ce qui concerne l'hépatite C, le stress oxydant serait induit par une protéine du virus. La protéine « core » se localiserait au niveau mitochondrial, particulièrement au point de contact de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique. Cet ancrage spécifique de la protéine inhiberait le transport d'électrons, augmentant ainsi la production d'ERO par la mitochondrie[188].

Dans la stéato-hépatite non alcoolique, une anomalie mitochondriale entraînerait une induction anormale du cytochrome P450. L'activité anormalement élevée de ce cytochrome serait à l'origine d'une genèse plus importante d'ERO, ces derniers étant directement responsables de surcharge du système d'anti-oxydant des hépatocytes dans les contextes de stress oxydant[189].

Les atteintes d'ischémie reperfusion sont également associées au contexte de stress oxydant médié au niveau de la mitochondrie. Ces atteintes sont impliquées dans de nombreux contextes cliniques tels que la transplantation hépatique, la chirurgie hépatique, le choc hémorragique et la réplétion volémique qui y est associée.[190].

Les résultats de recherche inclus dans ce mémoire de maîtrise permettent de caractériser un peu plus le mécanisme de mort cellulaire utilisé dans un contexte de stress oxydant médié par le cuivre. La multiplication des connaissances provenant de multiples modèles dans ce domaine permettra sans doute de résoudre le casse-tête des interactions entre les molécules pro-oxydantes, les protéines anti-oxydantes, les actions et modulations mitochondriales et de pouvoir prédire le résultat final de cette bataille et d'en modifier l'issue à bon essai.

Avenues thérapeutiques envisageables

La nature programmée et régulée de la mort cellulaire par apoptose présente un intérêt considérable par rapport à la mort moins prévisible et plus anarchique qu'est la nécrose. En définissant et en étudiant les mécanismes spécifiquement impliqués dans la mort d'une cellule, on peut identifier les étapes charnières de la cascade d'événements et moduler une ou plusieurs de ces étapes afin de changer le destin de la cellule.

L'apoptose chez le rat LEC demeure un phénomène dont les mécanismes sont méconnus, tout comme l'apoptose chez les hépatocytes subissant un stress oxydatif. Les résultats du présent travail de recherche ont permis d'identifier quelques cibles thérapeutiques potentielles. Le problème pourrait être abordé de manière globale par l'inhibition de l'activité de la caspase 3. Il pourrait également être abordé de manière plus spécifique en augmentant la transcription et la traduction de Bcl-2 ou d'autres gènes et protéines classiquement anti-apoptotiques telles que Bcl-X_L. Ces modifications pourraient être réalisées par l'insertion d'un vecteur contenant le gène au sein d'hépatocytes provenant d'un sujet malade. Une greffe autologue pourrait par la suite permettre la réinsertion d'hépatocytes plus résistants à l'apoptose chez l'animal ou le

patient. Il serait également possible de monitorer le devenir de ces cellules par des biopsies suivies de marquage histologiques spécifiques au vecteur utilisé. Inversement, on pourrait imaginer introduire des anticorps anti-Bad afin de réduire la quantité de protéine Bad fonctionnelle. Toutes ces modifications viseraient à rétablir l'équilibre entre les acteurs pro et anti-apoptotiques au sein de l'hépatocyte subissant un stress.

Contribution de l'apoptose au modèle de transplantation d'hépatocytes

Les conclusions de ce projet de recherche nous informent sur la mort des hépatocytes de rats LEC dans un contexte de surcharge de cuivre. Mais au-delà de l'avancement des connaissances auxquelles contribue ce travail dans le domaine de la maladie de Wilson, ces résultats constituent les premières étapes d'une application toute particulière du cuivre au modèle expérimental de transplantation d'hépatocytes impliquant le rat LEC.

La transplantation hépatique est une méthode thérapeutique reconnue pour traiter l'insuffisance hépatique terminale de plusieurs origines. Dans le cas des patients atteints de maladies métaboliques comme la maladie de Wilson, les indications sont plus restreintes, puisque le traitement médical offre un bon contrôle de la maladie et que les patients atteignent plus rarement le stade irréversible d'insuffisance hépatique décompensée. De plus, les avantages potentiels d'une greffe d'organe sont rapidement dénigrés par les risques potentiels d'une telle intervention et de l'immunosuppression nécessaire par la suite.

La transplantation d'hépatocytes présente un fort potentiel thérapeutique dans ce champ d'action. D'abord, cette approche pourrait offrir une correction à long terme des déficits métaboliques tels que la maladie de Wilson, la maladie de Crigler-Najjar, la tyrosinémie, le déficit en facteur IX, l'amyloïdose familiale, entre autres. Par ailleurs, cette technique pourrait servir de traitement de transition, offrant un support physiologique aux patients souffrant d'hépatite aiguë fulminante secondaire à une intoxication à l'acétaminophène ou à l'ingestion de champignons toxiques tels que

l'amanythe phalloïde. Le même type de transition pourrait être offert aux patients souffrant d'insuffisance hépatique sévère en attente d'une greffe.

Par ailleurs, la transplantation d'hépatocytes offre des avantages techniques intéressants. D'abord et avant tout, la technique en tant que tel est relativement peu complexe. Ce type de transplantation offre l'avantage de permettre de traiter plusieurs patients avec un seul organe prélevé, de conserver des cellules pour des utilisations ultérieures.

De nombreuses questions restent cependant à élucider avant que cette technique ne soit offerte de manière routinière aux patients atteints d'hépatite fulminante ou d'insuffisance hépatique terminale.

La question du stimulus employé représente une interrogation de premier plan dans ce domaine. Un stimulus idéal entraînerait les cellules transplantées à s'implanter dans le tissu hépatique et à y proliférer. Certains groupes de recherche se sont tournés vers la rétrocine pour inhiber la prolifération des hépatocytes natifs et donner ainsi un avantage compétitif aux cellules transplantées[191, 192]. Cette option implique d'énormes risques, puisqu'une prolifération infructueuse des hépatocytes transplantés serait fatale. D'autres ont utilisé l'irritation hépatique[193]. D'autres ont tenté de stimuler les hépatocytes à l'aide de facteurs de croissance[194, 195].

Notre groupe de recherche a tout récemment publié un article présentant les résultats de la transplantation d'hépatocytes chez le rat LEC[89]. Comme dans plusieurs protocoles expérimentaux de transplantation d'hépatocytes mis en pratique sur des animaux, nous avons utilisé l'hépatectomie partielle comme stimulus. Suite à cette intervention, les cellules de l'hôte et les cellules transplantées entrent dans un cycle de division cellulaire. Bien qu'efficace, cette technique présente le désavantage de compliquer grandement la transplantation d'hépatocytes. Son application chez l'humain est donc difficilement envisageable.

Paradoxalement, le rat LEC offre un avantage de par son déficit génétique. Cette délétion et le phénotype qu'elle engendre offrent un avantage compétitif aux cellules transplantées.

L'étude exposée dans le présent mémoire confirme que l'accumulation de cuivre hépatique entraîne la mort des hépatocytes par apoptose. Ce phénomène a en quelque sorte un effet comparable à celui de l'hépatectomie partielle. Dans les deux situations la population hépatocytaire totale diminue de manière significative.

Les effets de l'hépatectomie partielle sont bien connus et acceptés. La réponse physiologique de l'organisme à cette perte de substance hépatique est de libérer divers facteurs de croissance, faisant entrer les hépatocytes dans le cycle de division cellulaire. À moyen terme, le foie aura repris un volume normal.

Dans le cas de l'apoptose, de multiples hypothèses ont été émises quant au rôle qu'elle pourrait jouer dans le phénomène de régénération. Plusieurs gènes sont même impliqués à la fois dans les phénomènes d'apoptose et d'activation du cycle cellulaire[196]. Cependant, les données se font plus rares lorsqu'il s'agit de connaître l'effet que peut avoir un hépatocyte apoptotique sur la libération de facteurs de croissance par les cellules environnantes. Que ce soit par toxicité cellulaire ou par une action mécanique, il serait envisageable de croire que les effets physiologiques de l'un ou de l'autre type de retrait d'une portion significative du tissu hépatique soient similaires. Si tel est le cas, l'apoptose disposerait de plusieurs avantages sur l'hépatectomie partielle comme stimulus pour la transplantation d'hépatocytes. D'abord, le fait que l'apoptose soit simplement induite par l'administration de cuivre dans la diète rend la stimulation beaucoup moins morbide. La mortalité péri-opératoire était un des facteurs déterminant l'âge minimal des animaux transplantés par notre groupe. Une diminution des risques rattachés à la procédure de stimulation permettrait de tenter la transplantation chez des animaux plus jeunes. Les jeunes rats sont en anabolisme constant et comportent donc un potentiel prolifératif accru.

Ensuite, la durée d'action du stimulus apoptotique offre un potentiel intéressant que ne peut rencontrer l'hépatectomie partielle. Alors que l'intervention chirurgicale est un événement ponctuel et que son effet se tarit dans un délai limité, l'administration de cuivre pourrait être maintenue de manière continue. Une stimulation constante à des niveaux tolérés par les animaux serait potentiellement en mesure d'entretenir un niveau d'apoptose constant chez les hépatocytes natifs et donc, une constante libération de facteurs favorisant la prolifération des hépatocytes transplantés.

Évidemment, des études supplémentaires seront nécessaires avant d'envisager l'utilisation d'une diète enrichie en cuivre afin de stimuler l'implantation et la prolifération d'hépatocytes transplantés chez le rat LEC.

Bibliographie

1. Pennington JA, S.S., Salmon GD, Young B, Johnson RD, Marts RW, *Composition of core foods of the U.S. food supply, 1982-1991. III. Copper, manganese, selenium, and iodine.* Journal of Food Composition and Analysis, 1995. **8**: p. 171-217.
2. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdeum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.* 2001, National Academy Press: Washington, DC. p. chapter 7.
3. Lutsenko S, P.M., *Function and Regulation of the mammalian copper-transporting ATPases : insights from biochemical and cell biological approaches.* Journal of Membrane Biology, 2002. **191**: p. 1-12.
4. Linder MC, *Biochemistry of copper.* 1991, New York: Plenum Press.
5. Turnlund JR, *Human whole-body copper metabolism.* American Journal of Clinical Nutrition, 1998. **67**(supplement 5): p. 960S-964S.
6. Turnlund JR, K.W., Peiffer GL, Scott KC, *Copper absorption, excretion and retention by young men consuming low dietary copper determined by using stable isotope ^{65}Cu .* American Journal of Clinical Nutrition, 1998. **67**: p. 1219-1225.
7. Linder MC, L.N., Donley S, Mehrbod F, Cerveza P, Cotton S et al, *Copper transport in mammals,* in *Copper transport and its disorders,* M.J. Leone A, Editor. 1999, Kluwer Academic/Plenum: New York. p. 1-16.
8. Weiss KC, L.M., *Copper transport in rats involving new plasma protein.* American Journal of Physiology, 1985. **249**: p. E77-88.
9. Holmberg CG, L.C., *Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper containing protein and a description of some of its properties.* Acta chem scand, 1948. **2**: p. 550-556.
10. Winge DR, *Copper-regulatory domain involved in gene expression.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1998. **58**: p. 165-195.
11. Winge DR, J.L., Srinivasan C, *Metal-ion regulation of gene expression in yeast.* Current Opinion in Chemical Biology, 1998. **2**: p. 216-221.
12. Bertinato J, L.A.M., *Maintaining copper homeostasis : regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload.* Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**: p. 316-322.
13. Bertinato, J. and M.R. L'Abbé, *Maintaining copper homeostasis : regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload.* Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**: p. 316-322.
14. Zhou B, G.J., *hCTR1 : A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast.* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1997. **94**: p. 7481-7486.
15. Lee J, P.J., Thiele DJ, *Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homostasis and embryonic development.* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2001. **98**: p. 6842-6847.
16. Lee J, P.M., Thiele DJ, *Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent*

- copper transport system*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 40253-40259.
17. Petris, M.J., et al., *Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**: p. 9639-46.
 18. Hamza I, P.J., Gitlin JD, *Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2003. **100**(1215-1220).
 19. Culotta, V.C., et al., *The copper chaperone for superoxide dismutase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 23469-23472.
 20. Casareno, R.L., D. Waggoner, and J.D. Gitlin, *The copper chaperone CCS directly interacts with copp/zinc superoxide dismutase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 23625-23628.
 21. van de Sluis B, R.J., Pearson PL, van Oost BA, WijmengaC, *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population*. Human Molecular Genetics, 2002. **11**: p. 165-173.
 22. Tao TY, L.F., Klomp L, Wijmenga C, Gitlin JD, *The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with Wilson disease protein*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**: p. 41593-41596.
 23. Payne, A.S. and J.D. Gitlin, *Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the Copper-transporting P-type ATPases*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 3765-3770.
 24. La Fontaine, S., et al., *Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblast by expression of the Menkes and Wilson ATPases*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 31375-31380.
 25. Palmgren MG, A.K., *Evolution of P-type ATPases*. Biochimica Biophysica Acta, 1998. **1365**: p. 37-45.
 26. Frydman M, B.-T.B., Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, Goldwitch Z, *Assignment of the gene of Wilson's disease to chromosome 13 : linkage to the esterase D locus*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1985. **82**: p. 1819-1821.
 27. Tanzi RE, P.K., Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peppercorn J, Bush AI, Sternlieb L, Pirastu M, Gusella JF, Evgrafov O, Penchaszadeh OK, Honig B, Edelman IS, Scares MB, Scheinberg IH, Gilliam TC, *The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the menkes disease gene*. Nature Genetics, 1993. **5**(344-350).
 28. Ferenci P, Z.G., Trauner M, *Hepatic transport systems*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2002. **17** (suppl): p. S105-S112.
 29. Scarborough GA, *Structure and function of the P-type ATPases*. Current Opinion in Cellular Biology, 1999. **11**: p. 517-522.
 30. Lutsenko S, K.J., *Organization of P-type ATPases : significance of structural diversity*. Biochemistry, 1995. **34**: p. 15607-15613.
 31. DiDonato M, H.H., Narindrasorasak S, Que L Jr., Sarkar B, *Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 1890-1896.

32. Sarkar B, *Copper transport and its defect in Wilson disease : characterization of the copper-binding domain of Wilson disease ATPase*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2000. **79**: p. 187-191.
33. Yamaguchi Y, H.M., Gitlin JD, *Isolation and Characterisation of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1993. **197**: p. 271-277.
34. Bull PC, T.G., Rommens M, Forbes JR, Cox DW, *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nature Genetics, 1993. **5**: p. 327-337.
35. Kuo Y-M, G.J., Packman S, *Developmental expression of the mouse mottled and toxic milk genes suggests distinct functions of the Menkes and Wilson disease copper transporter*. Human Molecular Genetics, 1997. **6**: p. 1043-1049.
36. Murata Y, K.H., Abe T, Ishida N, Nishimura M, Levinson B, Gitschier J, Packman S, *Mutation analysis and expression of the mottled gene in the macular mouse model of Menkes disease*. Pediatric Research, 1997. **42**: p. 436-462.
37. Vulpe C, L.B., Whitney S, Packman S, Gitschier J, *Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase*. Nature Genetics, 1993. **3**(7-13).
38. Paynter JA, G.A., Lockhart P, Mercer JFB, *Expression of the Menkes gene homologue in mouse tissue : lack of effect of copper on the mRNA levels*. FEBS Letters, 1994. **351**: p. 186-190.
39. Saito T, O.M., Hosokawa T, Kurasaki M, Hata A, Endo F, Nagano K, Matsuda I, Urakami K, Saito K, *Immunohistochemical determination of the Wilson copper-transporting P-type ATPase in the brain tissues of the at*. Neuroscience Letters, 1999. **266**: p. 13-16.
40. Hung IH, S.M., Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD, *Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 21461-21466.
41. Roelofsen H, W.H., Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ, *Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion*. Gastroenterology, 2000. **119**: p. 782-793.
42. Schaefer M, H.R., Failla ML, Gitlin JD, *Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver*. American Journal of Physiology, 1999. **276**: p. G639-G646.
43. Lutsenko S, E.R., Tsivkovskii Walker JM, *Human copper transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) : biochemical properties and regulation*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2002. **34**: p. 351-362.
44. Payne AS, K.E., Gitlin JD, *Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1998. **95**: p. 10854-10859.
45. Suzuki M, G.J., *Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport*. Pediatrics International, 1999. **41**: p. 436-442.

46. Vanderwerf, S.M., et al., *Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 36289-36294.
47. Rae, T.D., et al., *Undetectable intracellular free copper : the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science, 1999. **284**: p. 805-808.
48. Stillman MJ, S.I.C., Suzuki KT,, ed. *Metallothioneins. Synthesis, structure and properties of metallothioneins, phytochelatins and metal-thiolate complexes*. 1992, Wiley: New-York.
49. Bremner I, *Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper*. Journal of Nutrition, 1987. **117**: p. 19-29.
50. Nederbragt, H., *Effect of the glutathione-depleting agents diethylmaleate, phorone and buthionine sulfoximine on biliary copper excretion in rats*. Biochemical Pharmacology, 1989. **38**: p. 3399-3406.
51. Houwen, R., et al., *Two pathways for biliary copper excretion in the rat. The role of glutathione*. Biochemical Pharmacology, 1990. **39**: p. 1039-1044.
52. Dijkstra M, V.R., Kuipers F, *How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport*. Journal of Hepatology, 1996. **24**(Supplement 1): p. 109-120.
53. Cater, M.A., et al., *ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 493-506.
54. Wilson SAK, *Progressive lenticular degeneration : a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*. Brain, 1912. **34**: p. 20-509.
55. Fleischer B, *Über eine der "Pseudosclerose" nahestehende bisher unbekannte Krankheit*. Deutsch Zeitschrift für Nervenheilkunde, 1912. **44**: p. 179-201.
56. Cumings JN, *Copper and iron content of brain and liver in normal and hepatolenticular degeneration*. Brain, 1948. **71**: p. 410-415.
57. Bearn AG, *A genetical analysis of 30 families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)*. Annals of Human Genetics, 1960(24): p. 33-43.
58. Danks DM, *Disorders of copper transport.*, in *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, B.A. Scriver CR, Sly WM, Valle D, Editor. 1995, McGraw-Hill: New-York. p. 2211-2235.
59. Gollan JL, G.T., *Wilson disease in 1998 : genetic, diagnostic, and therapeutic aspects*. Journal of Hepatology, 1998. **28**: p. 28-36.
60. Gitlin JD, *Wilson Disease*. Gastroenterology, 2003. **125**: p. 1868-1877.
61. Riordan SM, W.R., *The Wilson's disease gene and phenotypic diversity*. Journal of Hepatology, 2001. **34**: p. 165-171.
62. Siah, C.W., D. Trinder, and J.K. Olynyk, *Iron overload*. Clinica Chimica Acta, 2005. **358**(1-2): p. 24-36.
63. Scheinberg IH, G.D., *Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration Wilson's disease*. Science, 1952. **116**: p. 484-485.
64. Brewer GJ, *Recognition, diagnosis, and management of Wilson's disease*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 2000. **223**: p. 39-46.
65. Schilsky ML, *Diagnosis and treatment of Wilson's disease*. Pediatric Transplantation, 2002. **6**: p. 15-19.

66. Schilsky ML, *Wilson disease : genetic basis of copper toxicity and natural history*. Seminar in Liver Diseases, 1996. **16**: p. 83-95.
67. Fitzgerald MA, G.J., Goldstein NP, Wahner HW, McCall JT., *Wilson's disease (hepatolenticular degeneration) of late adult onset*. Mayo Clinic Proceedings, 1975. **50**: p. 438-442.
68. Marsden CD, *Wilson's disease*. Quaterly Journal of Medicine, 1987. **65**: p. 959-966.
69. Harada M, *Wilson disease*. Medical Electron Microscopy, 2002. **35**: p. 61-66.
70. Loudianos G, G.J., *Wilson's disease*. Seminar in Liver Diseases, 2000. **20**: p. 353-364.
71. Kato, J., et al., *Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats*. Japanese Journal of Cancer Research, 1993. **84**(3): p. 219-222.
72. Gitlin N, *Wilson's disease : the scourge of copper*. Journal of Hepatology, 1998. **28**: p. 734-739.
73. Gitlin, J.D., *Wilson Disease*. Gastroenterology, 2003. **125**: p. 1868-1877.
74. Sternlieb I, *Perspectives on Wilson's disease*. Hepatology, 1990. **12**: p. 1234-1239.
75. Van Wassenaeer-van Hall HN, v.d.H.A., Algra A, Hoogenraad TU, Mali WP., *Wilson disease findings at MR imagng and CT of the brain with clinical correlation*. Radiology, 1996. **198**: p. 531-536.
76. Ferenci, P., *Review article : diagnosis and current therapy of Wilson's disease*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2004. **19**: p. 157-165.
77. Ferenci P, *Review article : diagnosis and current therapy of Wilson's disease*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2004. **19**: p. 157-165.
78. Ludwig J, M.T., Rakela J., *The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease*. Liver International, 1994. **10**: p. 443-446.
79. Maier-Dobersberger T, M.C., Rack S, Granditsch G, Kaserer K, Korninger L, Steindl P, Gangl A, Ferenci P., *Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage anlysis*. Gastroenterology, 1995. **109**(6): p. 2015-2018.
80. Brewer GJ, Y.-G.V., *Wilson disease*. Medicine, 1992. **71**: p. 139-164.
81. Brewer GJ, *Wilson's disease : a clinician's guide to recognition*. 2001, Boston: Kluwer Academic.
82. Brewer GJ, F.J., Hereda P., *Diagnosis and treatment of Wilson's disease*. Seminar in Neurology, 1999. **19**: p. 261-270.
83. Brewer GJ, T.C., Aisen AM, Hill GM, *Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy*. Archive in Neurology, 1987. **44**: p. 490-493.
84. Brewer GJ, D.R., Johnson VD, Brunberg JA, Kluin KJ, Fink JK, *Treatment of Wilson's disease with zinc : XV long-term follow-up studies*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1998. **132**: p. 264-278.
85. Brewer GJ, H.P., Kluin KJ, Carlson M, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK, *Treatment of Wilson disease with ammonium tetrahiomolybdate : III. Initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy*. Archive in Neurology, 2003. **60**(3): p. 379-385.

86. Brewer GJ, S.M., Hedera P, Carlson MD, Fink JK, Askari FK, et al., *Double blind study of initial therapy of neurological Wilson's disease (abstract)*. J Invest Med, 2003. **51**.
87. Nazer H, E.R., Mowat ARW,, *Wilson's disease : clinical presentation and use of prognostic index*. Gut, 1986. **27**: p. 1377-1381.
88. Askari FK, G.J., Dick RD, Johnson BD, Brewer GJ,, *Treatment of Wilson disease with zinc : XVIII. Initial treatment of the hepatic decompensation presentation with trientine and zinc*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2003. **142**: p. 385-390.
89. Park, S.M., et al., *Hepatocyte transplantation in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease*. Cell Transplantation, 2006. **(publication acceptée)**.
90. Irani, A.N., et al., *Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease*. Molecular Therapy, 2001. **3**(3): p. 302-309.
91. Brewer, G.J. and F.K. Askari, *Wilson's disease : clinical management and therapy*. Journal of Hepatology, 2005. **42**: p. S13-S21.
92. Mori, M., et al., *The LEC Rat : a new model for hepatitis and liver cancer*, ed. Springer-Verlag. 1991, Tokyo.
93. Yoshida, M.C., et al., *New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat*. Journal of Heredity, 1987. **78**(6): p. 361-365.
94. Masuda, R., et al., *Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene*. Laboratory Animals, 1988. **22**(2): p. 166-169.
95. Li, Y., et al., *Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis : a model of Wilson's disease*. Journal of Clinical Investigation, 1991. **87**: p. 1858-1861.
96. Schilsky ML, I.A., Gorla GR, Volenberg I, Gupta S, *Biliary copper excretion capacity in intact animals : correlation between ATP7B function, hepatic mass, and biliary copper excretion*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2000. **14**: p. 210-214.
97. Suzuki M, A.T., *Impaired hepatic copper homeostasis in Long-Evans Cinnamon rats : reduced biliary excretion of copper*. Pediatric Research, 1994. **35**: p. 598-601.
98. Sugawara N, S.M., Yuasa M, Sugawara C, *Biliary excretion of copper, metallothionein, and glutathione into Long-Evans Cinnamon rats : a convincing animal model for Wilson disease*. Biochemical and Molecular Medecine, 1995. **55**: p. 38-42.
99. Togashi, Y., et al., *D-penicillamine prevents the development of hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats with abnormal copper meabolism*. Hepatology, 1992. **15**(1): p. 82-87.
100. Sone, H., et al., *Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans Cinnamon rats by the copper chelating agent trientine dihydrochloride*. Hepatology, 1996. **23**(4): p. 764-770.
101. Kang, J.H., et al., *Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine*. Hepatology, 1993. **18**: p. 614-620.

102. Wu, J., et al., *The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase homologous to the Wilson disease gene*. Nature Genetics, 1994. 7: p. 541-545.
103. Yamaguchi, Y., et al., *Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans Cinnamon rat*. Biochemical Journal, 1994. 301: p. 1-4.
104. Polio, J., et al., *Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature*. Journal of Clinical Gastroenterology, 1989. 11(2): p. 220-224.
105. Sasaki, N., et al., *The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog of the human Wilson disease gene*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1994. 202(1): p. 512-518.
106. Cuthbert, J., *Wilson's disease : a new gene and an animal model for an old disease*. Journal of Investigative Medicine, 1995. 43(4): p. 323-336.
107. Wu, J., et al., *The LEC rat has a deletion in copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson Disease gene*. Nature Genetics, 1994. 7: p. 541-545.
108. Yamamoto, H., et al., *In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. 30(5): p. 547-554.
109. Nakamura, M., et al., *Metal-induced hydroxyl radical generation by Cu⁺-metallothioneins from LEC rat liver*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. 231: p. 549-552.
110. Hayashi, M., et al., *Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. 276: p. 174-178.
111. Yoshikawa T, Y.Y., Naito Y., *Free radicals in chemistry*. Biology and Medicine, ed. O. International. 2000, London.
112. Favier A, *Le stress oxydant*. l'Actualité Chimique, 2003.
113. Kinsky N, *Antioxidants function carotenoids*. Free Radical Biology and Medicine, 1989. 7(6): p. 617-635.
114. Esterbauer H, G.J., Puhl H, Jurgens G., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radical Biology and Medicine, 1992. 13(4): p. 341-390.
115. Cadet J, B.S., Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S, *Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repara glycosylases*. Biological Chemistry, 2002. 383(6): p. 933-943.
116. Lemasters JJ, *V. Necrapotosis and the mitochondrial permeability transition : shared pathways to necrosis and apoptosis*. American Journal of Physiology, 1999. 276: p. G1-G6.
117. Granville DJ, C.C., Hunt DW, McManus BM, *Apoptosis : molecular aspects of cell death and disease*. Laboratory Investigation, 1998. 78: p. 893-913.
118. Reed JC, *Mechanisms of apoptosis*. American Journal of Pathology, 2000. 157(5): p. 1415-1430.
119. Lum, J.J., R.J. DeBerardinis, and C.B. Thompson, *Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. 6(6): p. 439-48.
120. Shimizu, S., et al., *Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes*. Nat Cell Biol, 2004. 6(12): p. 1221-8.

121. Strand S, H.W., Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Marini SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR, *Hepatic Failure and Liver Cell Damage in Acute Wilson's Disease Involve CD95 (APO-1/Fas) Mediated Apoptosis*. *Nature Medicine*, 1998. **4**(5): p. 588-593.
122. Kasahara I, S.K., Nakamura K., *Apoptosis in acute hepatic failure : histopathological study of human liver tissue using the tunel method and imunohistochemistry*. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 2000. **47**: p. 167-175.
123. Yoon JH, G.G., *Death receptor-mediated apoptosis and the liver*. *Journal of Hepatology*, 2002. **37**: p. 400-410.
124. Salvesen GS, D.V., *Caspases : intracellular signaling by proteolysis*. *Cell*, 1997. **91**: p. 443-446.
125. Wallach D, V.E., Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Moldin MP, *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms*. *Annual Review in Immunology*, 1999. **17**: p. 331-367.
126. Yuan J, *Transducing signals of life and death*. *Current Opinion in Cellular Biology*, 1997. **9**: p. 247-251.
127. Reed JC, *Cytochrome c : can't live with it, can't live without it*. *Cell*, 1997. **91**: p. 559-562.
128. Alnemri ES, L.D., Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. *Cell*, 1996. **87**: p. 171.
129. Cryns V, Y.Y., *Proteases to die for*. *Genes and Development*, 1999. **13**: p. 371.
130. Thornberry N, L.Y., *Caspases : enemies within*. *Science*, 1998. **281**: p. 1312-1316.
131. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(1): p. 10-22.
132. Salvesen GS, D.V., *Caspase activation : the induced-proximity model*. *Proceedures of the Natinal Academy of Science of the USA*, 1999. **96**: p. 10964-10967.
133. Lacronique, V., *Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice*. *Nature Medicine*, 1996. **2**: p. 80-86.
134. Rodriguez, I., et al., *A Bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection*. *Journal of Experimental Medicine*, 1996. **183**: p. 1031-1036.
135. Sokol RJ, S.M., Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumpricht E, Elkins N, Everson G, *Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids*. *Pediatric Research*, 2001. **49**(4): p. 519-531.
136. Bradham CA, Q.T., Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemaster JJ, *The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release*. *Molecular Cell Biology*, 1998. **18**: p. 6353-6364.
137. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. *Seminars in Immunology*, 2003. **15**: p. 185-193.
138. Newmeyer DD, F.-M.S., *Mitochondria : releasing power for life and unleashing the machineries of death*. *Cell*, 2003. **112**: p. 481-490.

139. Ricci JE, G.R., Green DR, *Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis*. Journal of Cell Biology, 2003. **160**: p. 65-75.
140. Kurose I, H.H., Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H, *Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 368-378.
141. Zhao Y, D.W., Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM, *Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement*. Gastroenterology, 2003. **125**: p. 854-867.
142. Reed JC, J.J., Matsuyama S, *Bcl-2 family proteins and mitochondria*. Biochimica Biophysica Acta, 1998. **1366**: p. 127-137.
143. Zamzami N, S.S., Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G., *Mitochondrial control of nuclear apoptosis*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**: p. 1533-1544.
144. Diaz JL, O.T., Horne W., *A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 11350-11355.
145. Oltvai ZN, M.C., Korsmeyer SJ, *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell, 1993. **74**: p. 609-619.
146. Schoemaker MH, M.H., *Defying death : the hepatocyte's survival kit*. Clinical Science, 2004. **107**: p. 13-25.
147. Schlesinger P, G.A., Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer S, *Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1997. **94**: p. 11357-11362.
148. Schendel SL, X.Z., Montal M.O., Matsuyama S, Montal M, Reed JC., *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1997. **94**: p. 5113-5118.
149. Schendel S, A.R., Pawlowski K, Godzik A, Kagan B, Reed JC, *Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 21932-21936.
150. Minn AJ, V.P., Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB., *Bcl-X_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes*. Nature, 1997. **385**: p. 353-357.
151. Antonsson B, C.F., Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC, *Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2*. Science, 1997. **277**: p. 370-372.
152. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. American Journal of Pathology, 2000. **157**(5): p. 1415-1430.
153. Kalekar, A. and C.B. Thompson, *Bcl-2 family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis*. Trends in Cell Biology, 1998. **8**: p. 324-330.
154. Desagher S, O.-S.A., Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC, *Bid-induced conformational change of Bax is*

- responsible for mitochondrial cytochrome *c* depletion during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 1999. **144**: p. 891-901.
155. Wang K, Y.W., Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ, *BID : a novel BH3 domain-only death agonist*. *Genes and Development*, 1996. **10**: p. 2859-2869.
 156. Green DR, R.J., *Mitochondria and apoptosis*. *Science*, 1998. **281**: p. 1309-1312.
 157. Gross A, Y.X., Wang K et al., *Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome *c* release, while BCL-X_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **274**: p. 1156-1163.
 158. Sun XM, B.S., Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM, *Bcl-2 and Bcl-X_L inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent activation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**: p. 11345-11351.
 159. Werner AB, d.V.E., Tait SW, Bontjer I, Borst J, *Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibits is collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**: p. 22781-22788.
 160. Finučane DM, B.-W.E., Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR, *Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome *c* release from mitochondria is inhibitable by Bcl-XL*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(2225-2233).
 161. Vander Heiden MG, T.C., *Bcl-2 proteins : regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?* *Nature Cell Biology*, 1999. **1**: p. E209-216.
 162. Luo X, B.I., Zou H, Slaughter C, Wang X, *Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. *Cell*, 1998. **94**: p. 481-490.
 163. Li H, Z.H., Xu CJ, Yuan J, *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway apoptosis*. *Cell*, 1998. **94**: p. 491-501.
 164. Yin XM, W.K., Gross A, Klocke B, Roth K, Korsmeyer S, *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. *Nature*, 1999. **400**: p. 886-891.
 165. Franke TF, C.L., *A bad kinase makes good*. *Nature*, 1997. **390**: p. 116-117.
 166. Datta S, B.A., Greenberg M, *Cellular survival : a play in three Akts*. *Genes and Development*, 1999. **13**: p. 2905-2927.
 167. Nechushtan A, S.C., Hsu YT, Youle R, *Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death*. *EMBO Journal*, 1999. **18**: p. 2330-2341.
 168. Kroemer G, R.J., *Mitochondrial control of cell death*. *Nature Medicine*, 2000. **6**: p. 513-519.
 169. Kelekar A, T.C., *Bcl-2-family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis*. *Trends in Cell Biology*, 1998. **8**(324-330).
 170. Li P, N.D., Budihardjo I, Srinivasula S, Ahmad M, Alnemri E, Wang X, *Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. *Cell*, 1997. **91**: p. 479-489.
 171. Frankfurt, O.S., *Decreased stability of DNA in cells treated with alkylating agents*. *Experimental Cell Research*, 1990. **191**(2): p. 181-5.

172. Frankfurt, O.S., D. Seckinger, and E.V. Sugarbaker, *Flow cytometric analysis of DNA damage and repair in the cells resistant to alkylating agents*. Cancer Research, 1990. **50**: p. 4453-4457.
173. Frankfurt, O.S., et al., *Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis*. Experimental Cell Research, 1996. **226**(2): p. 387-97.
174. Leist, M., et al., *Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1220-34.
175. Saile, B., et al., *CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1265-72.
176. Kato, J., et al., *Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 923-9.
177. Yamate, J., et al., *Macrophage populations and apoptotic cells in the liver before spontaneous hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats*. J Comp Pathol, 1999. **120**(4): p. 333-46.
178. Santon, A., et al., *Metallothionein-1 and metallothionein-2 gene expression and localisation of apoptotic cells in Zn-treated LEC rat liver*. Histochem Cell Biol, 2003. **119**(4): p. 301-8.
179. Grasl-Kraupp, B., et al., *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note*. Hepatology, 1995. **21**(5): p. 1465-8.
180. Fong, R.N., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **200**(2): p. 121-30.
181. Klein, D., et al., *Gene expression in the liver of Long-Evans cinnamon rats during the development of hepatitis*. Arch Toxicol, 2003. **77**(10): p. 568-75.
182. Strand, S., et al., *Hepatic Failure and Liver Cell Damage in Acute Wilson's Disease Involve CD95 (APO-1/Fas) Mediated Apoptosis*. Nature Medicine, 1998. **4**(5): p. 588-593.
183. Owen, C.A., Jr. and J.B. Hazelrig, *Copper deficiency and copper toxicity in the rat*. American Journal of Physiology, 1968. **215**(2): p. 334-338.
184. Yin, X.M., *Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes*. Journal of Molecular Medicine, 2000. **78**(4): p. 203-211.
185. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO/Fas) signaling pathways*. EMBO Journal, 1998. **17**(6): p. 1675-1687.
186. McKillop, I.H. and L.W. Schrum, *Alcohol and liver cancer*. Alcohol, 2005. **35**(3): p. 195-203.
187. Lieber, C.S., *Metabolism of alcohol*. Clinical Liver Disease, 2005. **9**(1): p. 1-35.
188. Korenaga, M., et al., *Mitochondrial dysfunction in hepatitis C*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2005. **39**((4 suppl. 2)): p. S162-S166.

189. Sanyal, A.J., *Mechanisms of disease : pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. Nature Clinical practice : Gastroenterology and Hepatology, 2005. **2**(1): p. 46-53.
190. Glantzounis, G.K., et al., *The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury : a review*. Liver Transplantation, 2005. **11**(9): p. 1031-1047.
191. Laconi, S., et al., American Journal of Pathology, 2001. **158**: p. 771-777.
192. Iranii, A.N., et al., *Correction of liver disease following transplantation of normal hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease*. Molecular Therapy, 2001. **3**(3): p. 302-309.
193. Guha, C., et al., *Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation*. Cancer Research, 1999. **59**(23): p. 5871-5874.
194. Patijn, G.A., et al., *Hepatocyte growth factor incudes hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 707-716.
195. Sugiyama, N., et al., *Intraportal administration of low-dose recombinant human hepatocyte growth factor enhances effects of hepatocellular transplantation*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(35): p. 1245-1249.
196. Fan, G., B.T. Kren, and C.J. Steer, *Regulation of apoptosis-associated genes in the regenerating liver*. Seminars in Liver Disease, 1998. **18**(2): p. 123-140.