

Université de Montréal

Le rôle de l'inflammation dans le développement des complications neurologiques associées à l'insuffisance hépatique aiguë chez la souris

par

Anne Chastre

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Sciences Biomédicales

Décembre 2012

©Anne Chastre, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Le rôle de l'inflammation dans le développement des complications neurologiques
associées à l'insuffisance hépatique aiguë chez la souris

présentée par :

Anne Chastre

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christopher Rose, président-rapporteur

Dr. Roger F. Butterworth, directeur de recherche

Dr. Marc Bilodeau, membre du jury

Dr. Marc Deschênes, membre externe

Dr. Jean-François Giguère, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'insuffisance hépatique aiguë (IHA) se caractérise par la perte soudaine de la fonction hépatique résultant de la nécrose massive des hépatocytes en l'absence de pathologie hépatique préexistante. L'IHA s'accompagne de perturbations métaboliques et immunologiques qui peuvent entraîner l'apparition de complications périphériques et cérébrales telles qu'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), une encéphalopathie hépatique (EH), un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne, et la mort par herniation du tronc cérébral. Les infections sont une complication fréquente de l'IHA et elles sont associées à un risque accru de développer un SIRS et une aggravation subséquente de l'EH avec un taux de mortalité augmenté.

L'ammoniaque joue un rôle majeur dans les mécanismes physiopathologiques qui mènent au développement de l'EH et de l'œdème cérébral, et des études récentes suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées. Le but de cette thèse est d'étudier le rôle des cytokines pro-inflammatoires circulantes et cérébrales dans le développement de l'EH et de l'œdème cérébral lors d'IHA.

Dans l'article 1, nous démontrons que l'inhibition périphérique du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) par l'etanercept retarde la progression de l'EH en diminuant le dommage hépatocellulaire, réduisant l'inflammation périphérique et centrale ainsi que le stress oxydatif/nitrosatif hépatique et cérébral associé chez la souris avec une IHA induite par l'azoxyméthane (AOM). Ces résultats démontrent un rôle important du TNF- α dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA d'origine toxique et suggèrent que l'etanercept pourrait constituer une approche thérapeutique dans la prise en charge des patients en attente de transplantation hépatique.

Dans l'article 2, nous simulons la présence d'une infection chez la souris avec une IHA induite par l'AOM pour mettre en évidence une éventuelle augmentation de la réponse inflammatoire. Nous démontrons que l'endotoxémie induite par le lipopolysaccharide (LPS) précipite la survenue du coma et aggrave la pathologie hépatique. Les cytokines pro-inflammatoires systémiques et cérébrales sont augmentées de façon synergique par le LPS lors d'IHA et résultent en une activation accrue de la métalloprotéinase matricielle-9 cérébrale qui s'accompagne d'une extravasation d'immunoglobulines G (IgG) dans le parenchyme cérébral. Ces résultats démontrent une augmentation majeure de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui contribue à la pathogenèse de l'EH lors d'IHA en condition infectieuse.

Les résultats de l'article 3 démontrent que l'augmentation de la perméabilité de la BHE lors d'IHA induite par l'AOM en condition non infectieuse ne résulte pas de l'altération de l'expression des protéines constitutives de la BHE.

Dans l'article 4, nous démontrons que l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque ou d'interleukine-1 β résulte en l'altération de gènes astrocytaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire et dans le stress oxydatif/nitrosatif. Un effet additif est observé dans le cas d'un traitement combiné au niveau des gènes astrocytaires impliqués dans le stress oxydatif/nitrosatif.

L'ensemble des résultats de cette thèse démontre un rôle important de l'inflammation périphérique et cérébrale dans la survenue des complications neurologiques lors d'IHA et une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués pourrait contribuer à la mise en place de stratégies thérapeutiques chez les patients atteints d'IHA en attente de transplantation.

MOTS-CLÉS

Encéphalopathie hépatique

Insuffisance hépatique aiguë

Azoxyméthane

Astrocytes

Ammoniaque

Cytokines pro-inflammatoires

Neuroinflammation

Facteur de nécrose tumorale-alpha

Infection

Barrière hémato-encéphalique

ABSTRACT

Acute liver failure (ALF) is the clinical manifestation of an abrupt loss of hepatic function resulting from a massive hepatocyte necrosis in a patient with no preexisting liver disease. ALF is associated with metabolic and immunological disturbances that may lead to peripheral and cerebral complications such as systemic inflammatory response syndrome (SIRS), hepatic encephalopathy (HE), brain edema, increased intracranial pressure (ICP) and ultimately death by cerebral herniation. ALF is frequently complicated by infections, which are known to increase the risk of developing a SIRS with a subsequent worsening of HE and higher mortality rates.

Ammonia plays a pivotal role in the pathophysiological mechanisms leading to HE and brain edema, and recent studies suggest that pro-inflammatory cytokines may also be involved. The aim of this thesis is therefore to investigate the role of circulating and cerebral pro-inflammatory cytokines in the setting of HE and brain edema during ALF.

In article No. 1, we demonstrated that peripheral inhibition of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by etanercept delays the progression of HE by reducing hepatocellular damage, decreasing peripheral and cerebral inflammation as well as associated oxidative/nitrosative stress in mice with ALF induced by azoxymethane (AOM). These findings demonstrate an important role of TNF- α in the pathophysiology of HE during toxic liver injury and suggest that etanercept may provide a therapeutic approach in the management of patient awaiting liver transplantation.

In article No. 2, we mimicked infection in mice with AOM-induced ALF in order to better understand the effects of an increased inflammatory response. We demonstrated

that endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS) precipitates the onset of coma and worsens the liver pathology. Peripheral and brain pro-inflammatory cytokines are synergistically raised by LPS during ALF and result in a large increase in cerebral matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity that was associated with immunoglobulin G (IgG) extravasation in the brain parenchyma. These results demonstrate a major increase of blood-brain barrier (BBB) permeability that contributes to the pathogenesis of HE during ALF with superimposed infection.

Results from article No. 3 demonstrate that increase of BBB permeability during AOM-induced ALF without superimposed infection is not due to alteration of BBB constitutive proteins.

In article No. 4, we demonstrated that exposure of cultured astrocytes to pathophysiological concentrations of ammonia or interleukin-1 β results in an alteration of the expression of astrocytic genes implicated in cell volume regulation and oxidative/nitrosative stress. An additive effect on astrocytic genes implicated in oxidative/nitrosative was made evident in case of co-treatment.

Taken together, results of the present thesis demonstrate a major role of peripheral and cerebral inflammation in the onset of neurological complications during ALF and a better understanding of the pathophysiological mechanisms implicated may contribute to new therapeutic strategies for ALF patients awaiting transplantation.

KEYWORDS

Hepatic encephalopathy

Acute liver failure

Azoxymethane

Astrocytes

Ammonia

Pro-inflammatory cytokines

Neuroinflammation

Tumor necrosis factor-alpha

Infection

Blood-brain barrier

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xv
REMERCIEMENTS	xvii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. L'encéphalopathie hépatique	2
1.1 Historique et définition	2
1.2 Étiologie et classification de l'EH	3
1.2.1 L'EH de type A	4
1.2.2 Les EH de type B et C	6
1.3 Neuropathologie de l'IHA	7
1.3.1 Les astrocytes	7
1.3.2 La microglie	9
1.3.3 Les neurones	10
1.3.4 Neuropathologie de l'EH lors d'IHA	12
2. Les modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë	14
2.1 Modèle <i>in vitro</i> de l'IHA : culture primaire d'astrocytes	15
2.2 Modèle <i>in vivo</i> de l'IHA : la souris traitée à l'azoxyméthane	15

3. Les facteurs périphériques impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique consécutive à une insuffisance hépatique aiguë.....	18
3.1 L'ammoniaque.....	19
3.1.1 Aspects biochimiques.....	20
3.1.2 Métabolisme de l'ammoniaque.....	21
3.1.3 Élimination de l'ammoniaque.....	21
3.1.4 Le rôle de l'ammoniaque dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA.....	24
3.2 Les cytokines pro-inflammatoires.....	26
3.2.1 Biologie et rôles des cytokines pro-inflammatoires dans la mort hépatocytaire lors d'IHA.....	27
3.2.2 Rôles des cytokines pro-inflammatoires dans la physiopathologie de l'EH consécutive à l'IHA.....	32
3.3 Autres facteurs provenant de la périphérie.....	34
3.3.1 Les espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène.....	34
3.3.2 Le lactate.....	35
4. Les mécanismes cérébraux impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique consécutive à l'insuffisance hépatique aiguë.....	36
4.1 La barrière hémato-encéphalique lors d'IHA.....	36
4.1.1 Structure et fonctions de la barrière hémato-encéphalique.....	36
4.1.2 Perturbation de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique lors d'IHA.....	41
4.1.3 La signalisation pro-inflammatoire foie-cerveau lors d'IHA.....	43
4.2 La neuroinflammation lors d'IHA.....	44
4.3 Le stress oxydatif/nitrosatif cérébral lors d'IHA.....	45
4.3.1 Sources du stress oxydatif/nitrosatif.....	45
4.3.2 Défense anti-oxydante cérébrale.....	46
4.3.3 Le stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA.....	47
4.4 Le volume cérébral lors d'IHA.....	48
4.5 Le métabolisme énergétique cérébral lors d'IHA.....	50

5. Les traitements de l'insuffisance hépatique aiguë.....	51
5.1 La transplantation hépatique.....	51
5.2 Les thérapies visant à diminuer les niveaux plasmatiques d'ammoniaque	51
5.2.1 L-ornithine L-aspartate (LOLA)	51
5.2.2 L-ornithine phénylacétate (OP).....	52
5.3 Les stratégies osmotiques visant à diminuer l'œdème cérébral.....	52
5.3.1 Le mannitol	52
5.3.2 La saline hypertonique	53
5.4 Les stratégies visant à diminuer l'inflammation systémique.....	53
5.4.1 Les antibiotiques	53
5.4.2 L'hépatectomie.....	54
5.5 N-acétylcystéine (NAC)	54
5.6 Foie artificiel.....	55
5.7 L'hypothermie	55
6. Buts de l'étude	57
CHAPITRE 2 : PRÉSENTATION DES ARTICLES	58
Premier article : Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications ..	59
Deuxième article : Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure	94
Troisième article : No changes in expression of tight junction proteins or blood-brain barrier permeability in azoxymethane-induced experimental acute liver failure.....	128
Quatrième article : Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure...	140

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE	160
1. Le rôle de l'inflammation stérile dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë.....	161
1.1 Le rôle de l'inflammation systémique dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA.....	162
1.2 Le rôle du TNF-α périphérique dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA	165
2. Le rôle de l'inflammation infectieuse dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë	168
3. Les mécanismes cérébraux inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë	173
3.1 La neuroinflammation et la signalisation foie-cerveau lors d'IHA	173
3.2 La barrière hémato-encéphalique et le rôle des métalloprotéinases matricielles dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA.....	175
3.3 Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA.....	180
3.4 Le gonflement astrocytaire dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA	183
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS	186
CHAPITRE 5 : SOMMAIRE	189
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	194

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1 : Manifestations cliniques et sévérité de l'encéphalopathie hépatique.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Table 1 : Effect of azoxymethane (AOM) on plasma transaminase activities, ammonia, TNF- α and IL-6 levels over time.

Table 2 : Effects of etanercept on plasma transaminase activities and ammonia levels.

ARTICLE 2

Table 1 : LPS increases plasma transaminases activities and ammonia levels in ALF mice.

ARTICLE 3

Table 1 : Oligonucleotide primers

CHAPITRE 3

Tableau 2 : Etudes cliniques ayant démontré une corrélation entre les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes et le taux de survie chez les patients atteints d'IHA.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1.1 : Etiologie de l'insuffisance hépatique aiguë aux Etats-Unis entre 1998 et 2007.
- Figure 1.2 : Conséquences neuropathologiques de l'insuffisance hépatique aiguë.
- Figure 1.3 : Activation microgliale lors de l'insuffisance hépatique aiguë.
- Figure 1.4 : Histopathologie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë induite par l'azoxyméthane chez la souris.
- Figure 1.5 : Structure schématique de l'etanercept.
- Figure 1.6 : Structure de la barrière hémato-encéphalique et couplage neurovasculaire.
- Figure 1.7 : Structure schématique des jonctions serrées reliant deux cellules endothéliales adjacentes

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

- Figure 1 : Etanercept significantly delays the progression of hepatic encephalopathy in mice with AOM-induced ALF.
- Figure 2 : Etanercept attenuates liver damage in AOM-induced ALF mice.
- Figure 3 : Etanercept treatment significantly attenuates plasma IL-6 and CD40L in AOM-induced ALF.

Figure 4 : Etanercept treatment attenuates IL-6 levels and microglial activation in the brain of mice with ALF.

Figure 5 : Western blot analysis of human IgG in the cerebral cortex of etanercept-treated AOM mice.

Figure 6 : Etanercept treatment attenuates oxidative stress in liver and brain.

ARTICLE 2

Figure 1 : Experimental design. Schematic representation of the procedures and timeline followed for each group of the study.

Figure 2 : LPS precipitates the onset of coma stages of HE.

Figure 3 : LPS worsens the hepatic pathology in ALF mice.

Figure 4 : Circulating pro-inflammatory cytokines are further increased at coma stages of HE in LPS-treated ALF mice.

Figure 5 : ALF mice challenged with LPS display a further increase of MMP-9 activity compared to ALF mice.

Figure 6 : LPS challenge results in IgG extravasation in brain of ALF mice at coma stages of encephalopathy.

Figure 7 : LPS challenge in ALF mice results in a further increase of cerebral IL-6 levels compared to ALF mice.

ARTICLE 3

Figure 1 : A) Water content of cerebral cortex in AOM-treated mice (ALF) or vehicle-treated controls. B) Lack of IgG extravasation in AOM-treated mice (ALF) and saline-treated controls.

Figure 2 : A) Representative western blots of ZO-1, ZO-2 and occludin in the frontal cortex of AOM-treated mice (ALF) compared to vehicle-treated controls. B) Quantification of the data shown in panel A.

ARTICLE 4

Figure 1 : Aquaporin-4 (AQP-4) mRNA expression (M1 and M23 isoforms)

Figure 2 : Glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA expression

Figure 3 : Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA expression

CHAPITRE 5

Figure 5.1 : Physiopathologie de l'EH et de l'œdème cérébral lors d'IHA.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Alanine aminotransférase
AOM	Azoxyméthane
AQP-4	Aquaporine-4
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AST	Aspartate aminotransférase
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD40L	CD40 ligand
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
EH	Encéphalopathie hépatique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GS	Glutamine synthétase
GSH	Glutathion
HO-1	Hème oxygénase-1
HO-2	Hème oxygénase-2
IgG	Immunoglobulines G
IHA	Insuffisance hépatique aiguë
IL-1 β	Interleukine-1bêta
IL-6	Interleukine-6
JS	Jonctions serrées
KO	« Knock-out »

LCR	Liquide céphalorachidien
LOLA	L-ornithine-L-aspartate
LPS	Lipopolysaccharide
NOS _e	Oxyde nitrique synthétase endothéliale
NOS _i	Oxyde nitrique synthétase inductible
NOS _n	Oxyde nitrique synthétase neuronale
MARS	« Molecular adsorbent recirculating system »
MMP-2	Métalloprotéinase matricielle-2
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle-9
NAC	N-acétylcystéine
NO	Oxyde nitrique
NF- κ B	Facteur nucléaire- κ B
PIC	Pression intracrânienne
RES	Système réticulo-endothélial
RNS	Espèces réactives du nitrogène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SNC	Système nerveux central
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale-alpha
TNFR1	Récepteur 1 au facteur de nécrose tumorale-alpha
TNFR2	Récepteur 2 au facteur de nécrose tumorale-alpha
ZO-1	Zonula occludens-1
ZO-2	Zonula occludens-2

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Dr. Roger Butterworth, pour ses conseils, sa patience et ses encouragements. Je vous remercie pour votre confiance au fil des ans et pour m'avoir permis de réaliser mon doctorat dans un milieu de travail enrichissant et stimulant. C'est également à vous que je dois cette formidable expérience de vie québécoise, et je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également le Dr. Paul Desjardins pour son encadrement attentif et bienveillant. Merci pour vos conseils et pour votre aide. Vous m'avez initiée et fait progresser dans la rigoureuse démarche scientifique avec humour, bonne humeur et gentillesse. Je vous remercie en outre pour avoir partagé votre bureau avec moi !

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr. Bélanger. Sans toi Mireille, je pense que je serais encore au labo en train de mesurer le GSH ! Merci pour ta patience, ta gentillesse, ta disponibilité, ton professionnalisme et ton soutien sans faille. Merci pour ton aide technique et rédactionnelle, merci pour ton soutien dans les moments difficiles, merci pour ta bonne humeur quotidienne. Je n'en serais pas là aujourd'hui. Eh oui, parfois tu es un peu brutale ;) , mais peut-être que je t'aurai appris à arrondir (un peu) les angles ! Je te remercie enfin pour le temps que tu as passé à relire et corriger ma thèse. Tu vas pouvoir à présent te consacrer à tes occupations sans être dérangée par l'o**** de française. Et j'espère un jour avoir l'honneur de goûter à ta bière !!!!

Je tiens également à remercier les Drs. Pomier et Rose, mes parrains de doctorat. Je vous remercie pour m'avoir accordé de votre temps, pour avoir toujours été disponibles et à mon écoute. Un merci tout particulier au Dr. Pomier pour ses précieux conseils, son aide, et ses remarques pertinentes quant à mes deux derniers articles.

Je remercie le Dr. Sarah Henzi pour ses conseils, sa gentillesse, sa disponibilité et son aide administrative. Je te remercie toi aussi pour avoir accepté de partager ton bureau avec moi ! Je remercie Juliette Jarvis pour son aide administrative et son soutien.

Je remercie mes collègues et amis du CRCHUM pour m'avoir permis de travailler dans un climat si agréable : Elizabeth Beauchesne, Chantal Bémour, Cristina Bosoi, Mélanie Tremblay, Shivraj Jhala, Georges Farah, Nadir Benslimane, Amal Nadiri, Malek Jundi, Vanessa Wacleche, le Dr Mourad et sa femme Farida, Richard Mongeau, Myriam Brodeur, Jean-Luc Petit, Alexandra St-Victor et Martin.

Je remercie mes parents et ma famille pour leur soutien et leur compréhension. Un merci particulier à Tinou, sans qui cette aventure n'aurait pas pu être possible. Je remercie Hugo pour sa patience et son soutien au quotidien. Merci aussi à mes amis : Marion, Seb, JB, Charles, Mazhou (et ses appels nocturnes pour cause de décalage horaire !), Rosalie, Johanna, PH, Jennifer, Fanny et Emmanuel. Merci également à Jeanne, Michel, Sylvana, Jean, Théo, Robert et Françoise.

Merci au département des Sciences Biomédicales et à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION

1. L'encéphalopathie hépatique

1.1 Historique et définition

L'encéphalopathie hépatique (EH) et les troubles neuropsychiatriques qui l'accompagnent ont été initialement décrits il y a plusieurs siècles par Hippocrate qui postulait que « ceux qui sont fous par excès de phlegme sont calmes, mais ceux qui le sont par excès de bile sont bruyants, violents et ne restent pas tranquilles » (Summerskill *et al.*, 1956). Hippocrate décrivait alors un patient atteint d'insuffisance hépatique aiguë. Ce n'est qu'au 20^e siècle que la première étude des manifestations neuropsychiatriques fut conduite par Sherlock et collègues sur une cohorte de 18 patients atteints de maladie hépatique et présentant des signes neurologiques (Sherlock *et al.*, 1954). Les auteurs mirent en évidence chez ces patients des troubles de la conscience accompagnés d'une perte d'expressivité du visage, de problèmes d'élocution ainsi que des troubles moteurs tels qu'un astérisis, des tremblements et une augmentation du tonus musculaire. Par la suite, ces mêmes auteurs décrivent des troubles de la vision, des hallucinations visuelles et une désorientation spatio-temporelle chez les patients atteints d'insuffisance hépatique chronique (Summerskill *et al.*, 1956). La définition actuelle reprend ces caractéristiques et souligne l'absence de séquelles neuropsychiatriques lorsque la fonction hépatique est rétablie. Ainsi, l'EH se définit comme un syndrome neuropsychiatrique complexe potentiellement réversible qui se caractérise par une perturbation des fonctions cognitives et motrices lors d'une insuffisance hépatique. En clinique, l'EH peut évoluer en quatre stades de gravité croissante, dont chacun se caractérise par des changements de l'état de conscience, de la fonction intellectuelle et du comportement spécifiques (Table 1).

Encéphalopathie	Etat de conscience	Fonction intellectuelle	Personnalité, comportement	Anormalités neuromusculaires
Stade 1	Troubles du sommeil	Troubles de l'attention, erreurs de calcul (additions)	Euphorie, dépression, irritabilité	Tremblements d'origine métabolique, décoordination, difficulté d'écriture
Stade 2	Léthargie, désorientation mineure	Amnésie, erreurs de calcul (additions, soustractions)	Changement de personnalité manifeste, comportement inapproprié	Elocution ralentie, astérisis, réflexes hyporéactifs, ataxie
Stade 3	Somnolence, semi-stupeur	Incapacité à calculer	Paranoïa, comportement étrange	Réflexes hyper-réactifs, nystagmus, signe de Babinsky, clonus, rigidité
Stade 4	Stupeur, inconscience	Aucune	Aucune	Pupilles dilatées, opisthotonus, coma

Tableau 1 : Manifestations cliniques et sévérité de l'encéphalopathie hépatique. Adapté de (Munoz 2008), avec la permission de W.B Saunders CO.

1.2 Étiologie et classification de l'EH

L'étiologie de l'EH est multifactorielle et il est communément accepté que des substances neurotoxiques normalement éliminées par le foie sain, telles que l'ammoniaque, jouent un rôle majeur dans la survenue des complications neurologiques lors d'insuffisance hépatique. De plus, la prévalence de l'EH est étroitement liée au type d'insuffisance hépatique rencontré, et plus la pathologie hépatique est sévère, plus le risque de développer une EH est grand (Munoz 2008). L'EH peut ainsi être classée en 3 catégories selon le type

d'insuffisance hépatique, la durée et la fréquence des troubles neurologiques (Ferenci *et al.*, 2002). On distingue donc l'EH qui est associée à une insuffisance hépatique aiguë (IHA) (type A), l'EH qui survient lors de dérivations entre les circulations portale et systémique en l'absence de toute atteinte du parenchyme hépatique (type B), et l'EH consécutive à une insuffisance hépatique chronique en cas de cirrhose accompagnée d'hypertension portale ou de dérivations porto-caves (type C).

1.2.1 L'EH de type A

L'IHA est la manifestation clinique d'une inflammation sévère et/ou d'une maladie nécrotique à déclenchement rapide en l'absence de pathologie hépatique préexistante qui s'accompagne d'une encéphalopathie dans les 8 semaines suivant l'apparition d'une jaunisse (Trey and Davidson 1970). L'IHA est une pathologie rare qui survient plutôt chez l'adulte jeune et qui est associée à un taux de mortalité élevé (80%). On estime ainsi qu'aux Etats-Unis elle représente 0.1% des décès toutes causes confondues, et environ 6% des décès liés aux maladies hépatiques (Hoofnagle *et al.*, 1995).

Les principales causes de l'IHA sont l'infection par les virus de l'hépatite A, B et E, et l'ingestion de substances médicamenteuses (Ichai and Samuel 2011). Les autres causes connues de l'IHA sont rares et incluent notamment les toxines hépatiques (amanite phalloïde), les troubles métaboliques et l'hépatite auto-immune (Fig 1.1). L'étiologie varie selon la localisation géographique et dépend de la prévalence des virus hépatotropes et du mode de consommation des médicaments. Ainsi, l'IHA consécutive à une infection virale prédomine dans les pays en voie de développement tandis qu'aux Etats-Unis et en Europe de l'ouest, elle est le plus souvent associée à une intoxication médicamenteuse (Bernal *et al.*, 2010). En particulier, la surdose d'acétaminophène (paracétamol), qu'elle soit non

intentionnelle ou associée à un comportement suicidaire, est la première cause d'IHA au Etats-Unis (46%) et en Angleterre (61%) (Lee *et al.*, 2008; Williams and Wendon 1994).

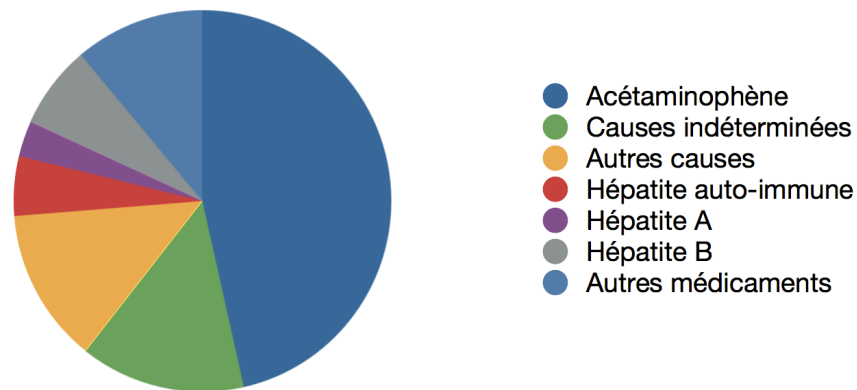


Figure 1.1 : Etiologie de l'insuffisance hépatique aiguë aux Etats-Unis entre 1998 et 2007. Adapté de (Lee *et al.*, 2008), avec la permission de John Wiley and Sons.

À l'examen clinique, les symptômes sont peu spécifiques et le patient présente une asthénie, un ictère, une anorexie, des vomissements, des douleurs abdominales, et la palpation du foie est généralement indolore. La pathologie peut évoluer rapidement et, en l'absence de régénération hépatique ou de transplantation, le taux de mortalité associé à l'IHA varie entre 40 et 80% (Gill and Sterling 2001). Ce taux de mortalité élevé s'explique par la survenue de complications majeures dont une augmentation de la susceptibilité aux infections, une instabilité hémodynamique, une hypoglycémie, une insuffisance rénale, une coagulopathie, et un collapsus cardio-pulmonaire qui résulte *in fine* en une défaillance multiviscérale. Au niveau du système nerveux central (SNC), les complications de l'IHA incluent le développement d'un œdème cérébral et l'apparition de l'EH. L'EH associée à l'IHA peut survenir et progresser en quelques heures et il n'est pas rare que l'état d'un patient orienté et communicatif (stade 1) évolue brusquement vers le stade de coma (stade 4) caractérisé par la stupeur et l'inconscience sans réponse aux stimuli douloureux. On définit ainsi l'IHA selon mode hyperaigu, aigu ou subaigu suivant que l'EH survient

respectivement une semaine, une à quatre semaines ou quatre à douze semaines après la jaunisse (O'Grady *et al.*, 1993). Cet intervalle de temps est un facteur capital dans le pronostic de la pathologie et paradoxalement, plus l'évolution est rapide meilleur est le taux de survie. L'œdème cérébral et l'augmentation de la pression intracrânienne (PIC) sont les complications les plus dangereuses pour la vie du patient, et le pronostic de l'IHA est inversement corrélé au degré de l'EH. En effet, si l'œdème cérébral est rarement retrouvé aux stade 1 et 2 d'EH, le risque atteint 25 à 35% au stade 3 et près de 80% au stade 4 d'EH (Munoz 1993).

1.2.2 Les EH de type B et C

Les encéphalopathies de type B et C sont associées à une insuffisance hépatique chronique qui survient lors de la formation de multiples vaisseaux collatéraux entre les systèmes porte et cave. Ces dérivations réduisent l'afflux sanguin au foie ce qui entraîne une diminution de la détoxification de substances neurotoxiques qui s'accumulent alors dans le sang. L'EH de type B survient en l'absence de pathologie hépatique intrinsèque, tandis que l'EH de type C est associée à la cirrhose et à l'hypertension portale (Ferenci *et al.*, 2002). Dans les deux cas, l'EH peut survenir et évoluer progressivement d'un état de confusion, de désorientation (stade 1) vers un état de somnolence et de coma (stade 4). L'EH peut s'accompagner d'un œdème cérébral qui, à la différence celui observé lors d'EH consécutive à une IHA, est dit de type léger en raison de mécanismes compensatoires qui en limitent l'évolution (Cordoba *et al.*, 2001). En outre, l'EH de type C est la forme la plus fréquente d'EH et elle est retrouvée chez 30 à 50% des patients cirrhotiques, dans sa forme la plus franche. Elle peut être classée selon la durée, la fréquence et l'intensité des symptômes. On distingue ainsi l'EH minimale, épisodique ou persistante. L'EH minimale

se caractérise par l'absence de signes observables ou par de légères anomalies qui se traduisent par des modifications subtiles du comportement et des troubles cognitifs qui peuvent avoir un impact sur la qualité de vie du patient et notamment affecter ses facultés de conduite automobile (Kim *et al.*, 2009). L'EH épisodique est associée à des troubles de la conscience et des changements cognitifs qui peuvent être spontanés ou précipités par différents facteurs comme par exemple l'hémorragie gastro-intestinale, les infections ou les médicaments. Enfin, l'EH persistante se définit par la présence de déficits cognitifs sur le long terme qui perturbent la vie sociale et professionnelle du patient.

L'ensemble des résultats expérimentaux de cette thèse ont été obtenus en conditions d'IHA, les sections suivantes traiteront donc de l'EH et de l'insuffisance hépatique dans leur forme aiguë.

1.3 Neuropathologie de l'IHA

L'EH consécutive à une IHA se caractérise par une gliopathie avec des perturbations astrocytaires et microgliales plutôt que neuronales. Avant d'aborder les conséquences neuropathologiques associées à l'EH consécutive à l'IHA, la section suivante présentera brièvement quelques-unes des fonctions astrocytaires, microgliales et neuronales dans les conditions physiologiques.

1.3.1 Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du cerveau et représentent 20 à 50% du volume cérébral. Initialement considérées comme de simples cellules de soutien, ces cellules gliales remplissent un grand nombre de fonctions cérébrales essentielles au bon

fonctionnement du SNC. D'un point de vue structurel, les astrocytes s'interposent entre les neurones et les vaisseaux sanguins et participent à la formation et au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE), une barrière anatomique et fonctionnelle qui sépare le SNC de la circulation sanguine et joue un rôle important dans l'homéostasie cérébrale (Kim *et al.*, 2006). D'un point de vue fonctionnel, les astrocytes sont notamment impliqués dans la régulation du flux sanguin cérébral et le couplage neurovasculaire, ils jouent un rôle de soutien dans le métabolisme énergétique et la neurotransmission, participent à la défense immunitaire et sécrètent un vaste répertoire de cytokines immunoactives (Anderson and Nedergaard 2003; Benveniste 1992; Haydon and Carmignoto 2006). Ces cellules dynamiques et métaboliquement actives émettent de longs prolongements cytoplasmiques qui leur permettent à la fois d'établir un réseau de communication avec les cellules voisines et d'autre part de contrôler localement l'environnement fonctionnel des neurones. Les astrocytes régulent notamment les concentrations ioniques extracellulaires, dont celles du potassium (Walz 1989), le pH et la glycémie cérébrale, fournissent les nutriments et les précurseurs de neurotransmetteurs nécessaires aux neurones, et participent à la recapture des neuromédiateurs dans la fente synaptique (Gee and Keller 2005; Schousboe and Waagepetersen 2005; Westergaard *et al.*, 1995). Par ailleurs, les astrocytes sont impliqués dans la détoxification de l'ammoniaque (Butterworth 2002) et la protection contre le stress oxydatif *via* la production de glutathion (GSH) (Dringen *et al.*, 2000).

Les astrocytes sont le principal type cellulaire affecté lors d'EH consécutive à une IHA. La perturbation des fonctions astrocytaires qui concourent notamment au métabolisme énergétique, à la recapture des neuromédiateurs et à l'homéostasie ionique pourrait donc résulter en une dysfonction neuronale à l'origine de l'apparition de certains symptômes de l'EH tels que les tremblements, l'ataxie et le coma. L'EH consécutive à une

IHA a été longtemps considérée comme une gliopathie primaire affectant principalement les astrocytes (Norenberg 1998), cependant des évidences récentes suggèrent un rôle important de la microglie dans la survenue des complications du SNC lors d'IHA.

1.3.2 La microglie

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du cerveau et représentent 10 à 20% du volume cérébral. En tant que phagocytes mononucléés, ces cellules présentatrices d'antigènes sont douées de phagocytose et sont capables de synthétiser une variété d'intermédiaires pro-inflammatoires dont des cytokines, des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des radicaux libres (Aloisi *et al.*, 2001). La microglie constitue le premier rempart immunitaire du SNC et dans les conditions physiologiques, ces cellules sentinelles surveillent en continu cet organe vital pour détecter et éliminer les médiateurs potentiels d'une infection ou d'un dommage cellulaire. Ces cellules émettent des prolongements cytoplasmiques hautement dynamiques qui leur permettent de sonder l'environnement cérébral et d'échanger des informations notamment avec les neurones et astrocytes voisins, qui les informent en retour de leur état cellulaire. Par ailleurs, les cellules microgliales participent à l'homéostasie cérébrale et sont notamment impliquées dans la maintenance et le renouvellement des synapses (Tremblay *et al.*, 2010), le support trophique aux neurones et aux autres cellules gliales (Langmann 2007), la clairance de neurotransmetteurs (Shaked *et al.*, 2005) et la phagocytose des débris cellulaires (Napoli and Neumann 2009). Lors d'une infection ou d'un traumatisme du SNC, les cellules microgliales détectent la présence de molécules anormales dans l'environnement extracellulaire (particules virales, débris cellulaires par exemple) et deviennent réactives, passant d'un phénotype restant ramifié au repos à un phénotype activé amiboïde. Les

cellules microgliales activées prolifèrent, migrent jusqu'au site lésé et sécrètent de nombreuses molécules inflammatoires telles que les cytokines pro- et anti-inflammatoires, les chimiokines, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du nitrogène (RNS), et les facteurs du complément (Lynch 2009). La fonction phagocytaire est également augmentée de même que l'expression de certains récepteurs membranaires dont les récepteurs aux chimiokines et les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Graeber and Streit 2010). Compte tenu des relations étroites entre la microglie et les autres types cellulaires cérébraux, les cytokines pro-inflammatoires et les ROS/RNS produits par la microglie activée peuvent entraîner une activation des astrocytes voisins et une amplification de l'inflammation (Ovanesov *et al.*, 2008) ainsi que l'apoptose des neurones de la région lésée (Griffin *et al.*, 1998).

De récentes études démontrent que l'EH consécutive à une IHA chez l'homme et dans les modèles animaux s'accompagne d'une activation de la microglie et d'une augmentation concomitante de l'expression des cytokines pro-inflammatoires cérébrales (Butterworth 2011), ajoutant une composante neuroinflammatoire à cette gliopathie.

1.3.3 Les neurones

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux et on estime que le cerveau humain contient environ 100 milliards de neurones. Les neurones sont des cellules hautement différenciées et spécialisées dans la communication intercellulaire qui peuvent être regroupées en différentes populations, selon leurs caractéristiques morphologiques ou neurochimiques par exemple. Ces cellules excitables et polarisées sont capables de recevoir, d'intégrer et de conduire l'information sous forme d'impulsion nerveuse par le biais de leur architecture spécifique et de leurs caractéristiques

membranaires. Les neurones sont constitués d'un soma, de dendrites ou ramifications qui permettent de récolter les informations en provenance d'autres neurones, et de l'axone, qui permet de transmettre l'information. Les neurones établissent ainsi un vaste et complexe réseau de communication dont l'élément fondamental est la synapse et qui constitue le point de transmission de l'information entre le neurone et ses cellules cibles. Chez l'homme, la majorité des synapses sont de type chimique c'est-à-dire qu'elles impliquent la libération dans la fente synaptique par l'élément pré-synaptique d'un neurotransmetteur qui peut être excitateur comme le glutamate ou inhibiteur comme l'acide gamma-aminobutyrique, et la fixation du neurotransmetteur au niveau de récepteurs spécifiques sur l'élément post-synaptique. En parallèle, les astrocytes voisins participent à la recapture et au recyclage du neurotransmetteur nécessaires au bon fonctionnement synaptique.

La perturbation de la neurotransmission peut avoir de graves conséquences et entraîner la mort neuronale, qui peut à son tour mener à des troubles cérébraux irréversibles puisque les neurones sont des cellules postmitotiques. Plusieurs études chez l'homme et dans les modèles animaux démontrent que l'EH consécutive à une IHA s'accompagne d'une perturbation de la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice qui affecte à la fois les systèmes glutamatergique, gabaergique et sérotoninergique (Felipo and Butterworth 2002). Cependant, aucun phénomène de mort cellulaire n'est observé lors d'IHA et les perturbations neuronales observées sont généralement attribuées aux dysfonctions astrocytaires. En particulier, il a été démontré une diminution de l'expression des transporteurs astrocytaires du glutamate (Chan *et al.*, 2000; Knecht *et al.*, 1997) et de la glycine (Zwingmann *et al.*, 2002) ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur périphérique aux benzodiazépines impliqué dans le transport du cholestérol et la synthèse de neurostéroïdes (Belanger *et al.*, 2005). Ces perturbations astrocytaires entraînent des

modifications de la neurotransmission qui concourent *in fine* aux troubles neurologiques caractéristiques de l'EH.

1.3.4 Neuropathologie de l'EH lors d'IHA

L'œdème cérébral et l'augmentation de la PIC sont des complications majeures de l'EH consécutive à une IHA qui peuvent mener à l'herniation cérébrale, une des principales causes de mortalité chez ces patients. L'étude *post-mortem* en microscopie électronique de cerveaux de patients décédés d'IHA a mis en évidence la présence d'un œdème cytotoxique principalement localisé au niveau des astrocytes, sans altération majeure de la BHE (Kato *et al.*, 1992). L'observation révèle la présence d'astrocytes périvasculaires gonflés, accompagnée d'une dilatation des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Fig. 1.2). Au niveau des capillaires, la membrane basale apparaît élargie tandis que les cellules endothéliales ont également un aspect gonflé suggérant une augmentation de la perméabilité de la BHE.

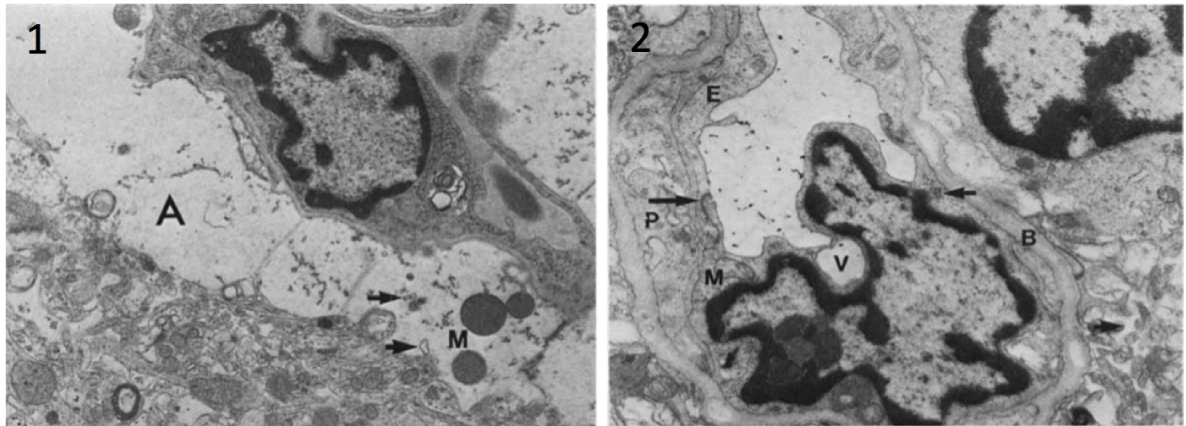


Figure 1.2 : Conséquences neuropathologiques de l'insuffisance hépatique aiguë. Coupes histologiques de cerveau de patient décédé à la suite d'une IHA. 1 : Astrocytes périvasculaires à l'aspect gonflé (A), réticulum endoplasmique dilaté (flèches) et mitochondries gonflées (M) ; 2 : cellule endothéliale gonflée (E), jonctions serrées intracellulaires à l'aspect intact (flèches), vacuole (V), membrane basale élargie (B), espaces extracellulaires dilatés (têtes de flèche) et péricyte (P). Extrait de (Kato *et al.*, 1992), avec la permission de John Wiley and Sons.

Plus récemment, des études immunohistochimiques sur des coupes de cerveaux de patients décédés d'IHA ont également mis en évidence une activation de la microglie comme le démontre l'augmentation de l'immunomarquage du CMH II (Fig. 1.3) (Butterworth 2011). La microglie activée apparaît alors de forme étoilée avec quelques courts prolongements cytoplasmiques. Elle sécrète en outre des cytokines pro-inflammatoires et des ROS/RNS, caractéristiques d'une neuroinflammation. Comme nous le verrons dans les sections suivantes, la physiopathologie de l'EH lors d'IHA implique un ensemble de facteurs parmi lesquels l'inflammation et l'ammoniaque jouent un rôle majeur.

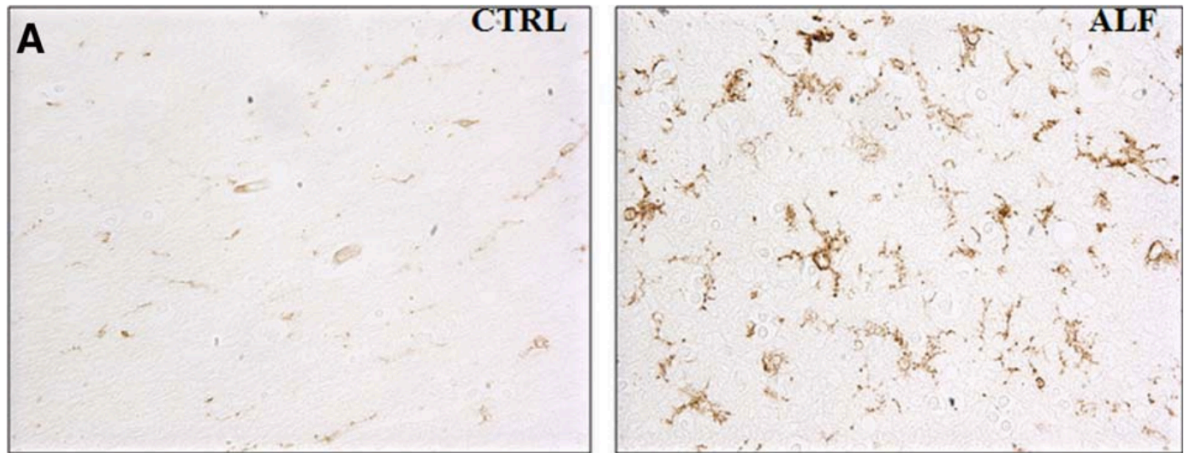


Figure 1.3 : Activation microgliale lors de l'insuffisance hépatique aiguë. Coupes immunohistochimiques du CMH II (HLA-DR clone CR3/43) dans le cerveau d'un patient témoin (CTRL) et dans le cerveau d'un patient décédé à la suite d'une IHA (ALF). Extrait de (Butterworth 2011), avec la permission de John Wiley and Sons.

Enfin, les neurones conservent un aspect morphologique normal et aucun phénomène de nécrose ou d'apoptose affectant quel que type cérébral que ce soit n'est observé lors d'IHA. Ces observations soulignent la réversibilité potentielle des troubles neurologiques consécutifs à l'IHA.

2. Les modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë

Par définition, un modèle expérimental permet de recréer certains des aspects d'une pathologie dans un environnement connu, contrôlé et reproductible d'une expérience à l'autre. Un modèle expérimental est donc une simplification de la pathologie étudiée en clinique où les variables biologiques d'intérêt peuvent être modifiées une à une pour en analyser les conséquences. Dans les sections suivantes, nous décrirons le modèle *in vitro* et le modèle animal à partir desquels les résultats de cette thèse ont été obtenus.

2.1 Modèle *in vitro* de l'IHA : culture primaire d'astrocytes

L'utilisation des cellules en culture permet d'étudier les conséquences de l'exposition directe à certaines substances qui sont augmentées lors d'IHA. En particulier, nous avons utilisé des astrocytes en culture puisque ce sont ces cellules qui subissent le gonflement cellulaire et qui sont à l'origine de l'apparition de l'œdème cérébral chez les patients atteints d'IHA. De plus, des études précédentes ont démontré que des astrocytes en culture exposés à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque manifestent plusieurs des changements morphologiques, métaboliques et neurochimiques observés chez les patients (Norenberg 1987). Cette technique est bien maîtrisée dans notre laboratoire (Chan *et al.*, 2004) et hautement reproductible.

Les cultures primaires d'astrocytes sont préparées à partir de cerveaux de rats nouveaux-nés (1 jour postnatal). Après prélèvement du cortex cérébral, le tissu est mécaniquement dissocié à l'aide de ciseaux puis filtré et resuspendu dans du milieu de culture classique (« Dulbecco's modified eagle medium ») supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal pour fournir les facteurs de croissance nécessaires au bon développement des astrocytes. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes de Pétri et cultivées sous atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de dioxyde de carbone pendant deux semaines jusqu'à confluence, puis maintenues une à deux semaines supplémentaires avec 10% de sérum de cheval pour permettre la maturation et la différenciation des cellules.

2.2 Modèle *in vivo* de l'IHA : la souris traitée à l'azoxyméthane

Le choix d'un modèle animal repose sur les objectifs de la recherche, les expériences ultérieures prévues pour répondre à la question posée et sur les caractéristiques techniques et pratiques intrinsèques du modèle. En 2009, la commission de l'*International*

Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) a établi une liste des critères nécessaires à la validation d'un modèle animal d'EH de type A (Butterworth *et al.*, 2009). Le modèle animal doit 1) reproduire la pathologie observée en clinique et permettre la gradation des symptômes de l'EH ; 2) présenter les différents symptômes neurologiques caractéristiques de l'EH incluant l'œdème cérébral, l'hypertension intracrânienne et l'herniation cérébrale ; 3) être potentiellement réversible ; 4) présenter une augmentation des concentrations plasmatiques et cérébrales en ammoniacque et en glutamine ; 5) être caractérisé sur le plan des pathologies hépatique et cérébrale ; 6) présenter un minimum de risque pour le personnel (toxines, virus). Il existe deux catégories de modèles animaux d'IHA soit les modèles chirurgicaux, basés sur l'hépatectomie (partielle ou totale) ou la dévascularisation du foie (anastomose porto-cave et ligature de l'artère hépatique) ; et les modèles d'hépatotoxicité qui consistent en l'injection de thioacétamide, de galactosamine, d'acétaminophène ou d'azoxyméthane (AOM).

L'AOM est un composé retrouvé dans les noix de palme de Cycade généralement utilisé dans des modèles animaux de carcinogenèse (Laqueur *et al.*, 1963). Le modèle murin d'IHA consécutif à l'AOM fut plus tard caractérisé par l'équipe du Dr. Benya (Matkowskyj *et al.*, 1999) puis défini d'un point de vue neurologique par notre unité (Belanger *et al.*, 2006). L'hépatotoxicité de l'AOM est dose-dépendante et repose sur une détérioration des fonctions mitochondriales (Matkowskyj *et al.*, 1999). La durée moyenne du modèle d'IHA est d'environ 16-18 h et débute par l'injection intrapéritonéale d'AOM (100 µg/g). Les souris développent progressivement une hypothermie et une hypoglycémie qu'il convient de contrôler et de maintenir à des valeurs normales par le biais de lampes et tapis chauffants, et d'injections de dextrose 10%. Sur le plan histologique, l'IHA se caractérise par la nécrose massive des hépatocytes, une congestion hémorragique et une

microstéatose vésiculaire (Fig 1.4) (Belanger *et al.*, 2006). La pathologie hépatique s'accompagne d'une hyperammonémie, d'une augmentation de la concentration plasmatique en transaminases (alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST)) et en acides aminés. Au niveau du SNC, l'EH survient quelques heures après l'injection et se caractérise par une diminution progressive de l'activité locomotrice et une ataxie (stades 1/2), la perte du réflexe de redressement (stade 3), et la perte du réflexe cornéen (coma, stade 4). On observe la présence d'un œdème cérébral au stade 4, et les concentrations cérébrales en ammoniacque ainsi qu'en glutamine sont augmentées.

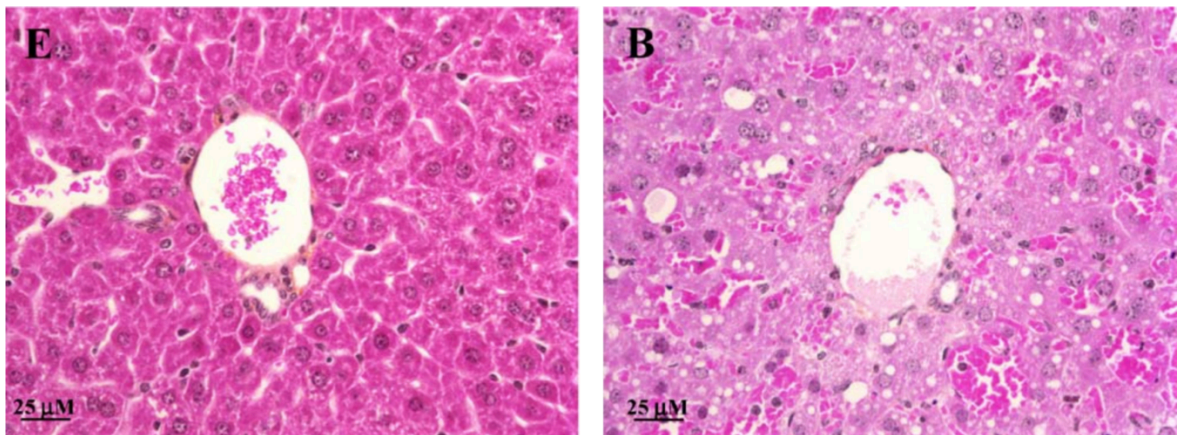


Figure 1.4 : Histopathologie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë induite par l'azoxyméthane chez la souris. (E) Foie sain ; (B) Foie de souris traitée à l'AOM au stade coma. L'IHA induite par l'AOM provoque une nécrose hémorragique massive et une microstéatose vésiculaire. Extrait de (Belanger *et al.*, 2006), avec la permission de Elsevier LTD.

Ces caractéristiques physiopathologiques sont hautement reproductibles et miment ce qui est observé en clinique tant au niveau cérébral que périphérique. Par ailleurs, le génome de la souris étant cloné et caractérisé, ce modèle d'IHA permet l'étude génétique

au niveau moléculaire. L'ensemble de ces caractéristiques font du modèle d'IHA induit par l'AOM un modèle expérimental de choix.

3. Les facteurs périphériques impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique consécutive à une insuffisance hépatique aiguë

Le foie est l'organe qui effectue le plus grand nombre de transformations chimiques. Il assure trois fonctions vitales que sont les fonctions de détoxification, de synthèse-dégradation et de stockage. Parmi ces fonctions, le foie réalise notamment la détoxification de substances exogènes potentiellement dangereuses telles que les toxines et les médicaments (clairance hépatique), mais également la clairance de substances endogènes telles que l'ammoniaque résultant du catabolisme des acides aminés, et les cytokines. Le foie est également impliqué dans la synthèse de protéines telles que les facteurs de coagulation, certaines protéines inflammatoires de la phase aiguë, et participe à la régulation de la glycémie. Par ailleurs, sa double irrigation par la veine porte et l'artère hépatique en font un organe à la croisée des environnements extérieur et intérieur et la cible potentielle des toxines et des organismes pathogènes d'origine alimentaire ou sanguine. L'environnement hépatique est donc contrôlé en permanence par les cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie, qui constituent la première ligne de défense en cas de lésions ou d'infections. De plus, le foie réalise la synthèse et le stockage de GSH, un puissant antioxydant qui permet à la fois de limiter le dommage cellulaire causé par les ROS/RNS lors d'inflammation hépatique, et qui contribue à la fonction de détoxification hépatique en tant que cofacteur dans les réactions de conjugaison.

L'IHA se caractérise par un degré sévère de mort hépatocellulaire qui peut être le résultat de processus apoptotiques ou nécrotiques. Des études expérimentales ont démontré que chaque processus est essentiellement conditionné par l'étiologie de l'IHA. Ainsi, la nécrose est principalement retrouvée lors d'intoxication à l'acétaminophène (Gujral *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2002) tandis l'apoptose survient plutôt dans le cas d'ischémie-reperfusion (Rudiger and Clavien 2002). Quels que soient les processus de mort cellulaire impliqués, les conséquences métaboliques qui résultent de l'insuffisance hépatique combinés à la présence de médiateurs de l'inflammation et de métabolites toxiques, ainsi que la capacité des hépatocytes restants à régénérer la masse hépatique, conditionnent le développement de l'IHA et sa sévérité (Wu *et al.*, 2010). Au niveau sanguin, la perte de fonction hépatique et l'inflammation locale et systémique qui caractérisent l'IHA induisent notamment une augmentation des concentrations en ammoniacque et en cytokines pro-inflammatoires, qui jouent un rôle important dans les mécanismes physiopathologiques des complications neurologiques lors d'IHA.

3.1 L'ammoniaque

Le rôle de l'ammoniaque dans la physiopathologie de l'EH fut initialement décrit par Nencki et Pavlov en 1893 lorsque ces derniers constatèrent le développement de troubles neurocomportementaux chez des chiens ayant subi une anastomose porto-cave chirurgicale (Hahn *et al.*, 1893). Dix jours à 6 semaines après l'intervention, les chiens présentaient un comportement agressif et irritable et développaient une ataxie, des convulsions et un coma. Les symptômes s'aggravaient après l'ingestion de viande, ce qui conduisit les auteurs à définir ces troubles comme « le syndrome d'intoxication par la viande » (« meat intoxication syndrome »). Par la suite, ils démontrèrent que l'excrétion

d'ammoniaque dans les urines était augmentée chez ces chiens et que l'administration d'ammoniaque précipitait de façon dose-dépendante la survenue des complications neurologiques (Nencki and Zaleski 1895). Un siècle plus tard avec l'avènement de la tomographie par émission de positrons, Lockwood et collègues mettaient en évidence un lien direct entre l'ammoniaque et la pathogenèse de l'EH (Lockwood *et al.*, 1991).

3.1.1 Aspects biochimiques

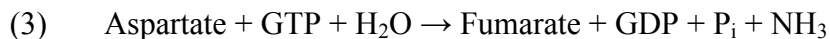
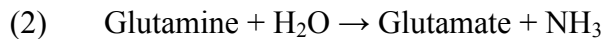
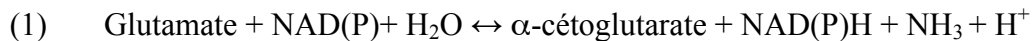
L'ammoniaque est un composé chimique qui peut être présent sous forme de base faible (NH_3 , gazeuse) ou d'acide faible (NH_4^+ , ionique) selon le pH. En solution aqueuse, on obtient l'équation :

$$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{HO}^-$$

Le pKa du couple ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) est de 9.15 (Bromberg *et al.*, 1960) et dans les conditions physiologiques de température et de pH, 98% de l'ammoniaque est sous forme ionique selon l'équation d'Henderson-Hasselbach. La forme gazeuse traverse passivement les membranes tandis que la forme ionique de l'ammoniaque, dont les propriétés physico-chimiques sont proches de celles de l'ion potassium (K^+), entre en compétition avec celui-ci et est transportée *via* les mêmes transporteurs membranaires tels que la pompe Na^+/K^+ ATPase et le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ par exemple (Aickin *et al.*, 1982; Kelly *et al.*, 2009; Moser 1987). Cependant, des études démontrent que le transport de l'ammoniaque est non saturable (Cooper *et al.*, 1979). Compte tenu de l'effet alcalin de l'ammoniaque (Weigle *et al.*, 1990) et du taux rapide de conversion entre la forme ionique (NH_4^+) et la forme gazeuse (NH_3) (Cooper and Plum 1987), on estime que 75% de l'ammoniaque traverse les membranes sous forme gazeuse et 25% sous forme ionique.

3.1.2 Métabolisme de l'ammoniaque

L'ammoniaque est un composé qui est physiologiquement produit en grande quantité chez un individu sain et plusieurs grammes rejoignent quotidiennement la veine porte (Cooper and Plum 1987). La majeure partie de l'ammoniaque provient de l'activité bactérienne et de la digestion des protéines dans l'intestin, ainsi que du muscle squelettique et du rein dans une plus faible proportion. Les principales voies de synthèse de l'ammoniaque impliquent les réactions enzymatiques catalysées par la glutamate déshydrogénase (réaction 1), la glutaminase (réaction 2), et l'acide-monophosphate désaminase du cycle des purines (réaction 3) (Cooper and Plum 1987).

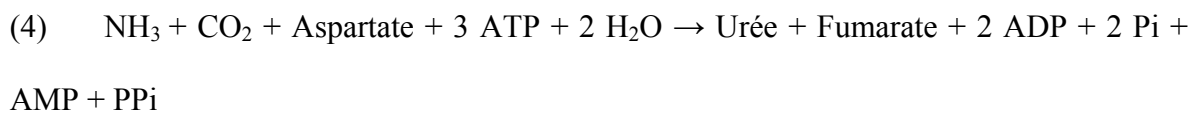


3.1.3 Élimination de l'ammoniaque

Comme énoncé dans les sections précédentes, l'ammoniaque est une substance neurotoxique et sa concentration doit donc être strictement régulée. Dans les conditions physiologiques, bien que la quantité produite d'ammoniaque soit importante, les concentrations artérielles sont maintenues aux alentours de 45 $\mu\text{mol/L}$ (Clemmesen *et al.*, 1999) grâce à une élimination efficace qui implique plusieurs organes et différentes voies enzymatiques.

3.1.3.1. Élimination par le foie

La différence de concentration en ammoniacque dans la veine porte (300 μM) et dans la veine cave (20 μM) illustre l'efficacité et le rôle majeur du foie dans la détoxification de l'ammoniacque (Haussinger *et al.*, 1985). Deux voies métaboliques distinctes mais complémentaires sont impliquées et reposent sur l'hétérogénéité enzymatique des populations d'hépatocytes. D'une part, en première ligne, les hépatocytes périportaux assurent la détoxification de l'ammoniacque sous forme d'urée car ils sont dotés des enzymes du cycle de l'urée à de fortes concentrations (Haussinger *et al.*, 1985). Ce système de faible affinité mais de haute capacité permet ainsi d'éliminer 70% de l'ammoniacque en provenance des intestins et de la périphérie sous forme d'urée (réaction 4). D'autre part, avant le retour du sang à la circulation générale, les hépatocytes périveineux assurent la détoxification de l'ammoniacque ayant échappé aux hépatocytes périportaux *via* la glutamine synthétase (GS) (réaction 5). Cette enzyme de haute affinité permet de convertir l'ammoniacque à de faibles concentrations sous forme de glutamine mais ce système de détoxification est de faible capacité puisque les hépatocytes périveineux ne représentent que 7% des hépatocytes totaux (Haussinger *et al.*, 1985). Par la suite lors d'un second passage par le foie, la glutamine ainsi formée sera hydrolysée par la glutaminase contenue dans les hépatocytes périportaux et l'ammoniacque libéré sera alors détoxifié sous forme d'urée.



3.1.3.2 Élimination par le muscle squelettique

Bien que le muscle squelettique ne possède pas l'ensemble des enzymes nécessaires au cycle de l'urée et qu'il soit plutôt producteur d'ammoniaque lors d'activité physique intense, il participe à la détoxification de l'ammoniaque *via* la GS. L'activité de cette enzyme contenue dans le muscle squelettique est faible mais compte tenu de la masse que représentent les muscles squelettiques, cette voie de détoxification joue un rôle important à l'échelle de l'organisme et on estime que 50% de l'ammoniaque artériel est métabolisé par le muscle (Ganda and Ruderman 1976; Lockwood *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'activité de la GS musculaire est augmentée lors d'hyperammonémie et s'accompagne d'une production nette de glutamine (Olde Damink *et al.*, 2002).

3.1.3.3 Élimination par le cerveau

L'ammoniaque est nécessaire au métabolisme des cellules gliales et une différence artério-veineuse positive est retrouvée chez l'individu sain ce qui suggère une entrée nette d'ammoniaque au niveau cérébral et une certaine capacité des cellules à le métaboliser (Cooper and Plum 1987). Tout comme le muscle squelettique, le cerveau est dépourvu de l'ensemble des enzymes nécessaires au cycle de l'urée et l'ammoniaque est converti en glutamine *via* la GS. La GS est principalement astrocytaire et 80% de son expression cérébrale est contenue dans les astrocytes contre 20% par les neurones (Cooper and Plum 1987; Norenberg and Martinez-Hernandez 1979). Les astrocytes métabolisent donc principalement l'ammoniaque en glutamine qui est alors transférée aux neurones pour permettre la synthèse de glutamate et d'acide gamma-aminobutyrique, deux importants neurotransmetteurs. Par ailleurs, à la différence du muscle, l'activité de la GS astrocytaire est constitutivement à son maximum et lors d'hyperammonémie on observe une

augmentation de la concentration cérébrale en ammoniacque avec des effets potentiellement neurotoxiques (Cooper and Plum 1987; Desjardins *et al.*, 1999).

3.1.3.4 Élimination par le rein

Le rein permet à la fois d'éliminer l'ammoniacque détoxifié par le foie sous forme d'urée et d'excréter une partie de l'ammoniacque sanguin dans les urines. Par ailleurs, bien que le rein soit plutôt producteur d'ammoniacque dans les conditions physiologiques, il participe au métabolisme de l'ammoniacque et exprime la GS (Welbourne *et al.*, 1986). La glutamine ainsi formée peut soit contribuer au métabolisme énergétique du rein et du foie, soit être hydrolysée et participer à l'excrétion d'ammoniacque dans les urines (Olde Damink *et al.*, 2009). Lors d'hyperammonémie consécutive à une IHA, le rein participe activement à l'élimination de l'ammoniacque et environ 70% des quantités normalement produites et relâchées dans la veine rénale sont directement excrétées dans les urines (Dejong *et al.*, 1993).

3.1.4 Le rôle de l'ammoniacque dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

Lors d'IHA, le foie nécrotique ne remplit plus ses fonctions et le métabolisme protéique et la fonction de détoxification sont altérés. Cela se traduit au niveau systémique par une hyperammonémie, et chez l'homme atteint d'IHA les concentrations plasmatiques en ammoniacque atteignent rapidement 0.1 à 0.45 mM (Clemmesen *et al.*, 1999). De même dans les modèles animaux d'IHA, l'hyperammonémie atteint 0.5 à 1 mM (Mans *et al.*, 1994) et les concentrations cérébrales en ammoniacque sont fortement augmentées. En effet, alors que le ratio entre les concentrations plasmatiques et cérébrales en ammoniacque est de 2 dans les conditions physiologiques, lors d'IHA les concentrations cérébrales en

ammoniaque atteignent en moyenne 8 fois la concentration en ammoniaque plasmatique et sont comprises entre 0.5 et 5 mM (Belanger *et al.*, 2006; Cooper and Plum 1987; Swain *et al.*, 1992). Par ailleurs, le fait que l'augmentation des concentrations en ammoniaque soit plus grande au niveau cérébral que plasmatique lors d'IHA suggère que la perméabilité du cerveau à l'ammoniaque est augmentée lors d'hyperammonémie (Lockwood *et al.*, 1991).

L'hyperammonémie consécutive à l'IHA peut conduire au gonflement astrocytaire et à l'augmentation de la PIC pouvant mener ultimement au décès par herniation du tronc cérébral. L'herniation cérébrale n'est pas spécifique à l'IHA et elle est également rencontrée dans d'autres syndromes hyperammonémiques tels que le syndrome de Reye ou les désordres congénitaux du cycle de l'urée (Kendall *et al.*, 1983). Tout comme l'IHA, ces syndromes hyperammonémiques s'accompagnent fréquemment de symptômes neuropsychiatriques comprenant des déficits cognitifs, des convulsions et la survenue d'un coma. La nature et la sévérité des complications neurologiques associées à l'hyperammonémie dépendent notamment des concentrations sanguines en ammoniaque. Lors d'IHA, il a en effet été démontré que l'incidence de l'herniation cérébrale et de l'augmentation de la PIC sont corrélées à l'augmentation des concentrations artérielles en ammoniaque chez l'homme (Clemmesen *et al.*, 1999). Ainsi, des concentrations artérielles en ammoniaque supérieures à 150 μM sont prédictives d'une mort par herniation cérébrale, et l'hypertension intracrânienne survient dans 55% des cas où elle est supérieure à 200 μM . Dans une étude plus récente, 70% des patients dont les concentrations artérielles en ammoniaque sont supérieures à 100 μM développent une EH (Bernal *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'infusion intraveineuse continue d'ammoniaque induit un gonflement astrocytaire et une augmentation de la PIC chez le jeune primate (Voorhies *et al.*, 1983) et chez le rat

normal (Takahashi *et al.*, 1991) tandis qu'une infusion semblable chez le rat ayant subi une anastomose porto-cave induit la survenue plus rapide de l'œdème cérébral et de l'augmentation de la PIC (Blei *et al.*, 1994). Enfin, l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque (5 mM) induit le gonflement de ces cellules (Norenberg *et al.*, 1991).

L'ensemble de ces données démontre donc que l'ammoniaque joue un rôle important dans la pathogenèse et le développement de l'EH et de l'œdème cérébral lors d'IHA.

3.2 Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont des glycoprotéines solubles de signalisation cellulaire synthétisées notamment par les cellules immunitaires et hépatocellulaires, et au niveau cérébral par la microglie et les astrocytes activés (Chung and Benveniste 1990; McCoy and Tansey 2008). Sécrétées dans le milieu extracellulaire à des concentrations de l'ordre du picomolaire, elles peuvent agir localement par effet autocrine et paracrine sur les cellules environnantes, et par effet endocrine lorsque la synthèse est plus importante comme c'est le cas lors d'IHA. Ces molécules ont des fonctions pléiotropiques, souvent redondantes, et induisent la transcription de gènes pro- ou anti-inflammatoires, de survie ou de mort cellulaire, de prolifération et de différenciation cellulaire. Les principales cytokines pro-inflammatoires sont le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), le CD40 ligand (CD40L), l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-1 β (IL-1 β), et lors d'IHA ces cytokines exercent des effets cytotoxiques directs ou indirects sur les hépatocytes. Avant d'aborder

leurs rôles dans la physiopathologie de l'EH consécutive à une IHA, nous détaillerons brièvement la biologie et le rôle de ces cytokines dans la mort hépatocytaire lors d'IHA.

3.2.1 Biologie et rôles des cytokines pro-inflammatoires dans la mort hépatocytaire lors d'IHA

Quelles que soient la nature et l'étiologie de l'IHA, la mort cellulaire massive des hépatocytes résulte en la libération de composants intracellulaires par les cellules du parenchyme hépatique. La présence de ces particules anormales conduit à une inflammation hépatique importante initiée et dirigée par les cellules de Kupffer, le premier rempart immunitaire, qui se traduit par une augmentation locale de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires potentiellement cytotoxiques tels que les ROS, les RNS, les cytokines, des médiateurs lipidiques, des enzymes hydrolytiques, etc. Ces médiateurs peuvent endommager directement l'environnement hépatocellulaire (peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique, peroxynitrite), dégrader la matrice extracellulaire (collagénase, élastase), provoquer le recrutement et l'activation d'effecteurs secondaires au site inflammatoire (monocytes, macrophages, lymphocytes, cellules NK, neutrophiles) ainsi que l'activation des cellules hépatocytaires et non-parenchymales voisines. L'activation subséquente de ces cellules conduit à la production de surcroît de médiateurs pro-inflammatoires. D'autre part, au niveau des hépatocytes, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées peuvent conduire à l'activation de voies de signalisation pro-apoptotiques *via* l'activation des caspases, ou anti-apoptotiques *via* le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B). L'ensemble de ces mécanismes inflammatoires immuns ou adaptatifs, combiné aux effets hépatotoxiques directs ou indirects responsables de l'inflammation primaire, favorise le développement du dommage hépatique et la progression de l'IHA.

3.2.1.1 Le facteur de nécrose tumorale- α

Le TNF- α est une cytokine majeure de l'inflammation qui peut induire l'apoptose de nombreux types cellulaires. En particulier, le TNF- α est impliqué dans l'apoptose excessive des hépatocytes lors d'atteinte hépatique d'étiologie variée (Rudiger and Clavien 2002; Simeonova *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 1999). Synthétisé sous forme de précurseur monomérique soluble ou membranaire, le TNF- α doit s'assembler sous forme d'homotrimère pour être biologiquement actif. Les formes solubles et membranaires interagissent avec deux types de récepteurs, le TNFR1 (p55) et le TNFR2 (p75), qui peuvent être solubles et participer à l'inhibition endogène des effets biologiques du TNF- α , ou membranaires et induire les effets biologiques du TNF- α . Ces deux récepteurs glycoprotéiques sont similaires au niveau structurel mais ils diffèrent par la structure de leur extrémité cytoplasmique. L'extrémité cytoplasmique de TNFR1 contient un domaine de mort qui peut conduire paradoxalement à l'activation de gènes pro-apoptotiques ou de survie cellulaire, et de gènes pro- ou anti-inflammatoires. Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de gènes de survie ou de mort cellulaire au niveau de l'hépatocyte demeurent incertains mais semblent impliquer les niveaux de GSH (Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa 2007). Au contraire, l'extrémité cytoplasmique de TNFR2 ne contient pas de domaine de mort et induit l'activation de gènes pro-inflammatoires et de survie cellulaire. En outre, à la différence de TNFR1 dont l'expression est quasi-ubiquitaire, TNFR2 n'exerce que peu d'effets biologiques compte tenu de son expression cellulaire limitée et de son affinité préférentielle pour la forme membranaire du TNF- α (Yang *et al.*, 2002). Ainsi, les effets du TNF- α sont essentiellement médiés par TNFR1,

dont l'expression est augmentée au niveau des hépatocytes et des cellules immunitaires lors d'IHA (Rutherford and Chung 2008; Streetz *et al.*, 2000).

Lors d'IHA, la principale source de TNF- α provient des cellules de Kupffer et de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré un effet cytotoxique direct de cette cytokine au niveau des hépatocytes. Dans l'IHA expérimentale induite par l'acétaminophène, le prétraitement avec un inhibiteur de l'activation des cellules de Kupffer prévient la nécrose hépatocytaire (Laskin *et al.*, 1995) tandis que l'injection d'anticorps anti-TNF- α prévient l'augmentation des concentrations plasmatiques en TNF- α et la nécrose des hépatocytes (Blazka *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que l'exposition de co-cultures d'hépatocytes et de cellules de Kupffer au lipopolysaccharide (LPS), un composant bactérien, induit la sécrétion de TNF- α et l'apoptose des hépatocytes et l'ajout d'anticorps anti-TNF- α protège les hépatocytes du dommage cellulaire (Hamada *et al.*, 1999). Le TNF- α peut également induire la nécrose cellulaire de façon indirecte par le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au site lésionnel.

Le TNF- α joue un rôle capital dans l'induction et le développement des processus inflammatoires. Il est souvent considéré comme le « chef d'orchestre » de la réponse inflammatoire puisqu'il est sécrété précocement et qu'il induit le recrutement des cellules immunitaires au site inflammatoire et la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires dont celles de l'IL-6 et l'IL-1 β . Lorsque sa synthèse ou sa clairance sont défaillantes, le TNF- α peut induire une inflammation chronique et conduire à l'apparition de pathologies auto-immunes. De nombreuses stratégies thérapeutiques visent d'ailleurs à diminuer l'inflammation induite par le TNF- α . En particulier, l'etanercept (Enbrel) est une molécule de synthèse qui agit comme un compétiteur inhibitif du TNF- α et l'empêche de se fixer à

ses récepteurs endogènes, limitant ainsi son action biologique (Scallon *et al.*, 2002; Tracey *et al.*, 2008). L'etanercept est une protéine de fusion constituée de deux domaines TNFR2 d'origine humaine couplés à un fragment Fc de l'immunoglobuline 1 (IgG1) humaine. Cette molécule de 150 kDa ne traverse pas la BHE et lie un trimère de TNF- α soluble ou membranaire d'origine périphérique dans un ratio de 1 pour 1 (Fig. 1.5). L'etanercept est 50 fois plus afffin et mille fois plus efficace que le TNFR2 monomérique d'origine endogène (Mohler *et al.*, 1993). De plus, la demi-vie de l'etanercept *in vivo* est de trois jours ce qui équivaut à cinq fois celle du TNFR2 monomérique (Alldred 2001). L'ensemble de ces caractéristiques ainsi que le haut volume de distribution de l'etanercept font de cette molécule un traitement de choix dans les maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis (Alldred 2001; Spadaro *et al.*, 2012). L'etanercept a par ailleurs été testé en clinique lors d'hépatite alcoolique (Boetticher *et al.*, 2008; Menon *et al.*, 2004). Les effets de l'etanercept lors d'IHA chez la souris font en outre l'objet d'une étude dans cette thèse.

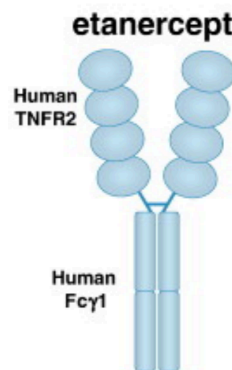


Figure 1.5 : Structure schématique de l'etanercept. L'etanercept est une protéine de fusion constituée de deux domaines TNFR2 couplés à un fragment Fc de l'immunoglobuline 1 (IgG1) humaine (FC γ 1). Extrait de (Tracey *et al.*, 2008), avec la permission de Elsevier INC.

3.2.1.2 Le CD40 ligand

Le CD40L est un membre de la famille du TNF et des études récentes suggèrent une implication importante de cette cytokine et de son récepteur CD40 dans les mécanismes de mort hépatocellulaire. Chez les patients atteints d'IHA et dans les modèles expérimentaux, on observe une augmentation de la concentration plasmatique en CD40L et la surexpression du récepteur CD40 au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer principalement, avant la survenue du dommage hépatocellulaire, ce qui suggère un rôle important de la dyade CD40/CD40L dans les mécanismes de mort des hépatocytes lors d'IHA (Leifeld *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2008). D'autre part, la surexpression de CD40L au niveau hépatique par injection d'un vecteur viral chez la souris induit un dommage hépatocellulaire similaire à celui observé lors d'IHA (Schmitz *et al.*, 2006).

3.2.1.3 L'interleukine-6

L'IL-6 interagit avec son récepteur, constitué de deux chaînes : le gp130 membranaire qui est ubiquitaire, et le IL-6R membranaire dont l'expression est limitée aux hépatocytes et à certains leucocytes. Lors d'IHA, la concentration plasmatique en IL-6 est fortement augmentée et de nombreuses études expérimentales démontrent qu'elle exerce paradoxalement un effet plutôt hépatoprotecteur. L'IL-6 induit notamment la prolifération des hépatocytes *in vitro* (Kuma *et al.*, 1990) et *in vivo* (Ohira *et al.*, 1996). De plus, l'injection d'IL-6 restaure la masse hépatique chez les souris « knock-out » (KO) pour l'IL-6 ayant subi une hépatectomie partielle (Cressman *et al.*, 1996), et elle prévient le dommage hépatocellulaire dans des modèles d'ischémie-reperfusion (Camargo *et al.*, 1997) et d'hépatotoxine (Kovalovich *et al.*, 2001).

3.2.1.4 L'interleukine-1 β

L'IL-1 β est produite sous forme de pro-IL-1 β qui doit être clivée par la caspase-1 pour être active et interagir avec son récepteur IL-1R1 membranaire, exprimé notamment par les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les hépatocytes. Tout comme le TNF- α , l'IL-1 β est rapidement synthétisée lors de la réponse inflammatoire et favorise le dommage cellulaire en contribuant notamment au recrutement des effecteurs secondaires au site inflammatoire et en augmentant la synthèse d'autres cytokines. Par ailleurs, des études expérimentales ont démontré que l'IL-1 β inhibe *in vitro* la prolifération des hépatocytes de rat et des cellules d'hépatome d'origine humaine (Boulton *et al.*, 1997). De plus, l'injection d'IL-1 β chez le rat ayant subi une hépatectomie partielle diminue la prolifération des hépatocytes et par conséquent la régénération de la masse hépatique (Boulton *et al.*, 1997).

3.2.2 Rôles des cytokines pro-inflammatoires dans la physiopathologie de l'EH consécutive à l'IHA

Lors d'IHA, le foie nécrotique est le siège d'une inflammation sévère et les cytokines pro-inflammatoires, sécrétées en grande quantité, rejoignent la circulation sanguine. Chez les patients, quelle que soit l'étiologie, les concentrations systémiques en TNF- α , CD40L, IL-6 et IL-1 β sont fortement augmentées et témoignent de la sévérité de l'atteinte hépatique (Koziel 1999; Sekiyama *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2008). En particulier, les taux de TNF- α et de CD40L sont corrélés au degré de sévérité de l'IHA et sont plus élevés chez les patients décédés que chez ceux qui ont survécu (Nagaki *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2008). D'autre part, les concentrations artérielles en TNF- α , IL-6 et IL-1 β sont corrélées à l'augmentation de la pression intracrânienne, ce qui suggère une augmentation

de la transduction des signaux inflammatoires de la périphérie au cerveau et souligne le rôle important des cytokines pro-inflammatoires systémiques dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA (Jalan *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2007). Dans les modèles animaux, les concentrations plasmatiques en TNF- α , IL-6 et IL-1 β sont également augmentées notamment chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009a) et chez la souris traitée à l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010a). De plus, la survenue du coma hépatique est significativement retardée chez les souris KO pour TNFR1 ou IL-1R lors d'une IHA induite par l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010b). Enfin, les taux plasmatiques de TNF- α sont corrélés à la fréquence de survenue et à la sévérité de l'EH, et à une diminution de l'activité locomotrice chez le rat avec une IHA induite par le thioacétamide (Chu *et al.*, 2001).

Lors d'IHA, le foie inflammé est responsable en majeure partie de l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes. À fortes doses, elles peuvent entraîner des complications immunologiques et organiques. En particulier lors d'IHA, il a été mis en évidence une dépression du système réticulo-endothélial (RES), essentiellement localisé au niveau hépatique, ainsi qu'une dysfonction des cellules de Kupffer et des leucocytes caractérisée par une diminution de la fonction de l'opsonine, une déficience du complément et la sécrétion excessive d'agents immunosuppresseurs (Odeh 2007). Ces troubles immunologiques entraînent d'une part une augmentation de la translocation bactérienne des intestins vers les nœuds lymphatiques et la circulation portale (Kasravi *et al.*, 1996), et d'autre part un risque accru de développer un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) et des infections (Rolando *et al.*, 2000). Le SIRS est une inflammation généralisée incontrôlée retrouvée chez 60% des patients atteints d'IHA qui est associée à

une aggravation de l'EH et à un taux de mortalité élevé (Rolando *et al.*, 2000; Schmidt and Larsen 2006). Le SIRS peut être d'origine infectieuse ou la conséquence de l'inflammation hépatique *per se* lors d'IHA, cependant 50 à 90% des patients atteints d'IHA contractent une infection nosocomiale ou endogène ce qui augmente le risque de développer un SIRS avec une aggravation subséquente de l'EH (Rolando *et al.*, 2000; Vaquero *et al.*, 2003). Enfin, le rein est l'organe qui réalise l'essentiel de la clairance des cytokines et l'insuffisance rénale est une complication fréquente de l'IHA, particulièrement aux stades avancés de la maladie. De plus, la présence d'un SIRS lors d'IHA est associée à un risque élevé de développer une insuffisance rénale sévère avec un taux de mortalité accru (Leithead *et al.*, 2009).

3.3 Autres facteurs provenant de la périphérie

Une vingtaine de composés différents, autres que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires, sont augmentés au niveau sanguin lors d'IHA. Certains ont des effets neuroactifs ou neurotoxiques comme les acides gras à chaîne courte, les acides aminés aromatiques, la bilirubine et les benzodiazépines, et peuvent ainsi contribuer à la physiopathologie de l'EH (Butterworth 2003). D'autres, comme les intermédiaires du stress oxydatif/nitrosatif et le lactate, peuvent également jouer un rôle dans les mécanismes inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de l'EH consécutive à l'IHA.

3.3.1 Les espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène

Le stress oxydatif/nitrosatif et l'inflammation sont étroitement liés et la production de ROS et de RNS peut à la fois induire ou être la conséquence d'une inflammation. Lors d'IHA, la production des espèces radicalaires, dont le peroxyde d'hydrogène et le

peroxynitrite par exemple, peut être la conséquence soit d'un désordre métabolique hépatocytaire comme c'est le cas lors d'une intoxication à l'acétaminophène (Jaeschke *et al.*, 2012) soit de la réaction inflammatoire consécutive à la mort des hépatocytes (Wu *et al.*, 2010). Les défenses anti-oxydantes du foie sont rapidement dépassées lors d'IHA et les radicaux libres entraînent des dommages cellulaires qui contribuent à la mort des hépatocytes. D'autre part, les ROS et RNS sont libérés dans la circulation générale et peuvent induire une vasodilatation généralisée, une coagulation disséminée et des lésions endothéliales diffuses. Dans les modèles animaux, l'augmentation des taux plasmatiques et cérébraux de nitrites/nitrates est retrouvée chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009b), et chez la souris traitée à l'AOM, l'administration de N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant puissant, retarde la progression de l'EH, améliore la fonction hépatique et prévient la déplétion des stocks hépatiques de GSH limitant ainsi les effets cytotoxiques du stress oxydatif/nitrosatif (Bemeur *et al.*, 2010a).

3.3.2 Le lactate

Le lactate est un métabolite du glucose dont les concentrations plasmatiques et cérébrales sont augmentées chez les patients atteints d'IHA (Tofteng *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1999). L'hyperlactatémie observée lors d'IHA peut avoir plusieurs origines dont une augmentation du métabolisme anaérobique hépatique en conséquence d'une hypoxie hépatocellulaire (Bihari *et al.*, 1985), la libération du lactate intracellulaire par les hépatocytes nécrotiques (Clemmesen *et al.*, 2000) et une diminution du métabolisme du lactate du fait de la nécrose hépatocytaire (Woll and Record 1979). L'augmentation des concentrations plasmatiques et cérébrales en lactate est retrouvée dans de nombreux modèles animaux d'IHA d'origine chirurgicale (Holmin *et al.*, 1983; Mans *et al.*, 1994) ou

toxique (Peeling *et al.*, 1993). L'augmentation du lactate cérébral est corrélée aux changements neurologiques caractéristiques de l'EH et est associée à une augmentation de la PIC avec un taux de mortalité élevé (Deutz *et al.*, 1988; Nyberg *et al.*, 1998).

4. Les mécanismes cérébraux impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique consécutive à l'insuffisance hépatique aiguë

Lors d'IHA, l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires relâchés par le foie nécrotique rejoignent la circulation générale et jouent un rôle dans la physiopathologie de l'EH, en particulier au niveau de la BHE et des cellules gliales.

4.1 La barrière hémato-encéphalique lors d'IHA

Plus que tout autre organe, le cerveau doit être protégé des variations anormales de son environnement ionique ou de toute substance potentiellement toxique en provenance de la circulation générale. Avant d'aborder le rôle de la BHE dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA, la prochaine section présente la structure et la fonction de la BHE dans les conditions physiologiques.

4.1.1 Structure et fonctions de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière anatomique et fonctionnelle qui sépare le parenchyme cérébral de la circulation sanguine et participe à l'homéostasie cérébrale. Cette structure hautement spécialisée est constituée, sur la face luminale du capillaire cérébral, d'une monocouche de cellules endothéliales cérébrales, reliées entre elles notamment par des jonctions serrées (JS) étanches; et sur la face abluminale d'une lame basale, de péricytes et

de pieds d'astrocytes périvasculaires (Figure 1.6) (Hallenbeck *et al.*, 2006). La BHE permet ainsi d'une part de protéger les neurones en les isolant de tout contact direct avec les capillaires, et d'autre part de réguler l'afflux sanguin cérébral par l'intermédiaire des astrocytes selon les besoins neuronaux. Les vaisseaux sanguins, les astrocytes et les neurones forment en effet une unité fonctionnelle appelée *unité neurovasculaire*. Le couplage neurovasculaire est essentiel au bon fonctionnement cérébral et une variation du diamètre vasculaire peut entraîner des perturbations au niveau du transport des substrats énergétiques, des nutriments, mais également modifier la clairance de neurotoxines cérébrales. Les astrocytes jouent un rôle central dans ce couplage puisqu'ils recouvrent 95% de la surface des capillaires.

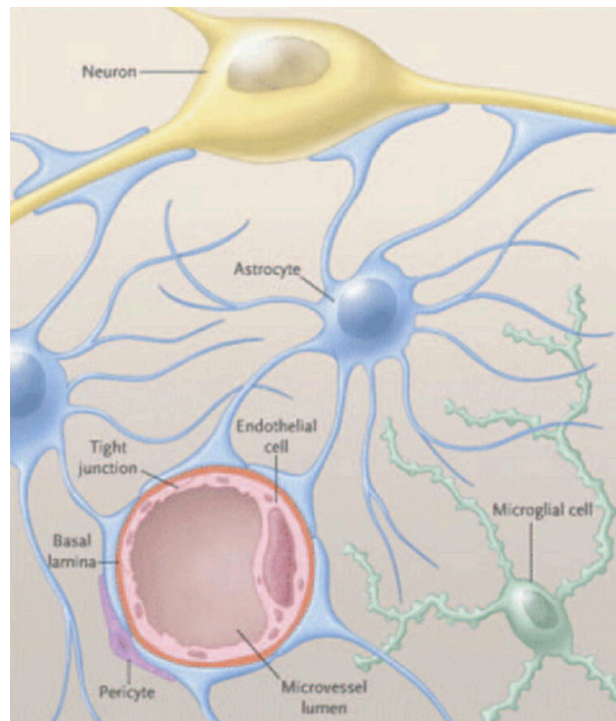


Figure 1.6 : Structure de la barrière hémato-encéphalique et couplage neurovasculaire. La barrière hémato-encéphalique est constituée des cellules endothéliales cérébrales, de la lame basale, des péricytes, et des pieds des astrocytes périvasculaires. Extrait de (Hallenbeck *et al.*, 2006), avec la permission de Lippincott Williams & Wilkins.

L'endothélium vasculaire cérébral, en première ligne, régule de façon très stricte le passage des molécules de la périphérie vers le parenchyme cérébral (et inversement). Les molécules peuvent emprunter la voie transcellulaire, qui nécessite des transporteurs spécifiques pour traverser la monocouche de cellules endothéliales cérébrales, ou la voie paracellulaire entre les cellules endothéliales adjacentes, selon le gradient de concentration de la molécule. Cependant, l'espace paracellulaire est quasiment imperméable à toute molécule du fait de la présence des jonctions serrées, situées au pôle apical des membranes endothéliales, et seules les molécules gazeuses, lipophiles ou d'un poids moléculaire inférieur à 180 Da peuvent diffuser librement. Les JS, complexes protéiques formés des zonula occludens (ZO), de l'occludine et de la claudine-5, jouent donc un rôle essentiel dans le contrôle de la voie paracellulaire et le maintien de l'intégrité de la BHE. Du côté cérébral, les astrocytes périvasculaires jouent également un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la BHE et sont notamment impliqués, avec les cellules endothéliales cérébrales, dans le remodelage de la matrice extracellulaire *via* les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes physiopathologiques de l'EH lors d'IHA et font l'objet d'une étude dans cette thèse.

4.1.1.1 Les claudines

Les claudines sont des protéines transmembranaires qui constituent la clé de voute des JS avec notamment la claudine-5 qui est majoritairement exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux (Sirotkin *et al.*, 1997). La claudine-5 forme des homodimères qui s'associent avec les homodimères de claudine-5 de la cellule endothéliale adjacente, formant ainsi la structure primaire des JS. La claudine-5 joue un

rôle de premier plan dans la structure et le maintien de JS et participe à la perméabilité de la BHE (Zlokovic 2008).

4.1.1.2 L'occludine

L'occludine est une protéine transmembranaire qui contribue à la structure et à la stabilisation des JS. L'occludine participe avec les claudines à la perméabilité et à la forte résistance électrique des JS. Ses deux boucles extracellulaires sont impliquées dans l'adhésion paracellulaire tandis que son extrémité C-terminale intracellulaire interagit avec ZO-1 (Ando-Akatsuka *et al.*, 1996). L'occludine joue un rôle important dans la perméabilité de la BHE et la délétion de ses domaines N-terminal et C-terminal altère la structure des JS et augmente la perméabilité paracellulaire (Balda *et al.*, 1996; Bamforth *et al.*, 1999).

4.1.1.3 Les zonula occludens

Les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines adaptatrices qui appartiennent à la famille des kinases guanylate associées à la membrane (MAGUK) (Persidsky *et al.*, 2006). Les ZO sont des protéines d'échafaudage sous-membranaires qui participent à l'organisation structurelle des complexes de JS. Elles établissent des jonctions d'une part *via* leur domaine PDZ avec l'extrémité C-terminale de l'occludine et des claudines, et d'autre part *via* leur extrémité C-terminale avec le cytosquelette d'actine. Ces protéines accessoires sont essentielles au maintien de l'intégrité de la BHE et une diminution de l'expression de ZO-1 par exemple, est associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE lors d'hypoxie expérimentale (Fischer *et al.*, 2002).

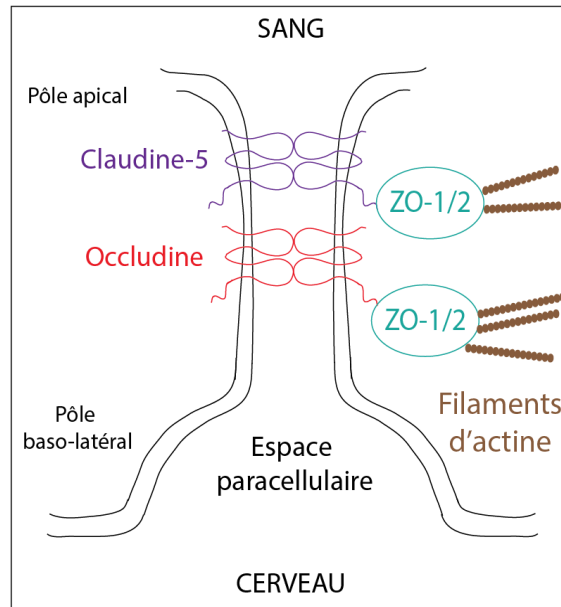


Figure 1.7 : Structure schématique des jonctions serrées reliant deux cellules endothéliales adjacentes.

4.1.1.3 Les métalloprotéinases matricielles

Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes qui dégradent la plupart des composants de la matrice extracellulaire dont la fibronectine, la laminine, et les protéoglycans par exemple (Rosenberg 2002). Les MMPs sont exprimées par la plupart des composants cellulaires de l'unité neurovasculaire et au niveau périphérique par les macrophages et lymphocytes. Au sein de la grande famille des MMPs, on distingue notamment MMP-2 (gélatinase A) et MMP-9 (gélatinase B) qui, après activation enzymatique, dégradent la membrane basale autour des capillaires et facilitent ainsi l'angiogenèse et la neurogenèse (Sternlicht and Werb 2001). MMP-2 est principalement exprimée au niveau des pieds astrocytaires, de façon constitutive, tandis que MMP-9 est plutôt exprimée par les cellules endothéliales cérébrales et les péricytes et est inductible en présence de ROS et de cytokines *via* NF- κ B notamment (Mun-Bryce and Rosenberg 1998). En particulier, MMP-9 peut être exprimée par la microglie activée et les astrocytes réactifs

(Gottschall and Deb 1996). MMP-2 et MMP-9 sont impliquées dans la rupture de la BHE lors de processus neuroinflammatoires impliqués dans l'ischémie, la sclérose en plaque et la méningite d'origine bactérienne (Cunningham *et al.*, 2005; Leppert *et al.*, 2001). En plus de dégrader les composants de la matrice extracellulaire, il a été démontré que MMP-2 et MMP-9 peuvent dégrader les JS et notamment la claudine-5, l'occludine et ZO-1 (Petty and Lo 2002).

4.1.2 Perturbation de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique lors d'IHA

L'étude en microscopie électronique de coupes de cerveaux de patients décédés d'IHA met en évidence un gonflement des astrocytes et le maintien de l'intégrité de la BHE, avec une probable augmentation de sa perméabilité du fait du gonflement des cellules endothéliales cérébrales et d'une augmentation du passage transcellulaire par pinocytose/endocytose (Kato *et al.*, 1992). L'œdème cérébral observé lors d'IHA est donc de nature cytotoxique et n'implique pas de rupture franche de la BHE. Des études plus récentes démontrent cependant des changements de la perméabilité lors d'IHA impliquant une modification de l'expression des protéines constitutives des JS. L'augmentation de la perméabilité de la BHE à la fluorescéine est en effet associée à diminution de l'expression de ZO-2 dans un modèle d'IHA induite par l'AOM chez la souris (Shimajima *et al.*, 2008), et une diminution de l'expression de l'occludine a été mise en évidence à la fois chez les patients atteints d'IHA et dans un modèle d'IHA induite par la galactosamine chez la souris (Lv *et al.*, 2010). D'autre part dans cette même étude, l'injection intraveineuse d'anticorps anti-TNF- α ou anti-TNFR1 chez la souris prévient la baisse d'expression de l'occludine observée, suggérant un rôle important du TNF- α circulant au niveau de la perméabilité de

la BHE. L'implication des cytokines pro-inflammatoires dans le changement de perméabilité de la BHE est également appuyée par une étude *in vitro* qui démontre une augmentation du passage transcellulaire et de l'endocytose associés à une diminution de l'expression des JS dans des cellules endothéliales en culture exposées au TNF- α et à l'IL-6 (Duchini *et al.*, 1996). D'autre part, l'infusion d'ammoniaque chez le rat sain conduit à une extravasation du bleu Evans, ce qui suggère que l'ammoniaque est également impliqué dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE (Ziylan *et al.*, 1993).

D'un point de vue mécanistique, de récentes études suggèrent un rôle important des MMPs dans la régulation la perméabilité de la BHE lors d'IHA, et plus particulièrement de MMP-9 dont l'activité est régulée par les signaux pro-inflammatoires. L'augmentation des taux plasmatiques de MMP-9 activée, provenant du foie nécrotique, est en effet associée à une augmentation de la perméabilité au bleu Evans au stade coma d'IHA chez la souris traitée à l'AOM (Nguyen *et al.*, 2006), et l'expression cérébrale de MMP-9 est corrélée à l'augmentation de la PIC et à l'extravasation de bleu Evans chez le rat traité à la galactosamine (Cauli *et al.*, 2011). Une diminution de l'expression de la claudine-5 et de l'occludine est également observée chez la souris traitée à l'AOM, et elle est corrélée à l'activation de MMP-9. De plus, l'injection intrapéritonéale d'un inhibiteur de MMP-9 chez ces souris réduit l'extravasation du bleu Evans et retarde la survenue du coma (Chen *et al.*, 2009). Enfin plus récemment, une étude *in vitro* démontre que l'exposition de cellules endothéliales en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque entraîne l'activation de MMP-9 et de MMP-2 et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Skowronska *et al.*, 2012), suggérant que les cytokines pro-inflammatoires et l'ammoniaque jouent un rôle dans la régulation de l'activité des MMPs et l'expression des JS.

Les conséquences de la diminution de l'expression des JS et le rôle que joue MMP-9 dans l'augmentation effective de la perméabilité de la BHE restent cependant controversés. En effet, les niveaux plasmatiques de MMP-9 ne sont pas corrélés à l'augmentation de la PIC chez les patients atteints d'IHA (Palenzuela *et al.*, 2010) et des études de résonance magnétique démontrent que la BHE reste anatomiquement intacte lors d'IHA chez l'homme (Ranjan *et al.*, 2005) et dans un modèle de dévascularisation hépatique chez le rat (Chavarria *et al.*, 2010). D'autre part, l'efficacité thérapeutique du traitement au mannitol dans le contrôle de l'œdème cérébral, qui repose sur la différence osmotique entre la périphérie et le compartiment cérébral, soutient le fait que la BHE demeure globalement intacte lors d'IHA. L'ensemble de ces données suggère donc des changements subtils de la perméabilité de la BHE lors d'IHA, avec une augmentation du passage de l'ammoniaque et des signaux pro-inflammatoires en provenance de la périphérie vers le cerveau, dont les mécanismes physiopathologiques restent encore cependant à clarifier.

4.1.3 La signalisation pro-inflammatoire foie-cerveau lors d'IHA

La BHE est à l'interface entre les compartiments périphérique et cérébral et elle joue donc un rôle important dans le transfert des signaux pro-inflammatoires originaires du foie jusqu'au cerveau. Différents mécanismes ont été proposés tels que 1) le passage direct des cytokines pro-inflammatoires au cerveau au niveau des régions dépourvues de BHE fonctionnelle (organes circumventriculaires), 2) le transport actif des cytokines pro-inflammatoires *via* leurs récepteurs spécifiques (TNFR1, TNFR2, CD40, IL1-R1, IL-6R) exprimés par cellules endothéliales cérébrales, 3) l'activation des cellules endothéliales en réponse à la fixation des cytokines pro-inflammatoires sur leurs récepteurs spécifiques et la

synthèse de seconds messagers (monoxyde d'azote (NO), prostaglandines), 4) l'interaction des cytokines pro-inflammatoires en périphérie avec les fibres afférentes du nerf vague, 5) le recrutement et l'entrée de cellules immunitaires activées (monocytes, macrophages, lymphocytes) dans le parenchyme cérébral (Capuron and Miller 2011; D'Mello and Swain 2011). Par ailleurs, des études *in vitro* suggèrent que l'ammoniaque (Skowronska *et al.*, 2012) et les cytokines pro-inflammatoires (Duchini *et al.*, 1996) augmentent la perméabilité des cellules endothéliales cérébrales et le passage transcellulaire, ce qui pourrait favoriser ainsi la signalisation pro-inflammatoire au cerveau.

4.2 La neuroinflammation lors d'IHA

L'observation initiale d'une neuroinflammation provient des modèles expérimentaux d'IHA où une augmentation de l'expression cérébrale du TNF- α et de l'IL-1 β a été mise en évidence chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2006). Par la suite, la présence d'un flux positif de cytokines pro-inflammatoires du compartiment cérébral vers la périphérie a été démontrée chez les patients atteints d'IHA (Wright *et al.*, 2007) et des études immunohistochimiques de coupes de cerveaux de patients décédés ont mis en évidence une activation de la microglie (Butterworth 2011). L'activation de la microglie est également retrouvée chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique, et l'augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires dans le liquide céphalorachidien (LCR) et dans le parenchyme cérébral est corrélée à la progression de l'EH et à la survenue du coma (Jiang *et al.*, 2009a). D'autre part, la délétion des gènes codant pour TNFR1 ou IL-1R1 chez la souris traitée à l'AOM retarde la progression de l'EH et la survenue du coma (Bemeur *et al.*, 2010b).

L'origine de la neuroinflammation lors d'IHA n'est pas formellement établie mais, comme discuté plus tôt, les cytokines pro-inflammatoires périphériques jouent certainement un rôle important dans l'activation de la microglie. D'autre part, l'infusion intraveineuse d'ammoniaque chez le rat induit une activation de la microglie (Rodrigo *et al.*, 2010), tandis que l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque conduit à un stress oxydatif/nitrosatif *via* l'activation de la voie NF- κ B (Jayakumar *et al.*, 2011), voie qui est également activée lors d'inflammation (Laroux *et al.*, 2001). Les cytokines pro-inflammatoires et l'ammoniaque semblent donc jouer un rôle conjoint dans la neuroinflammation lors d'IHA.

4.3 Le stress oxydatif/nitrosatif cérébral lors d'IHA

Le stress oxydatif/nitrosatif se définit comme le déséquilibre entre la production de radicaux libres et la défense anti-oxydante. Avant d'aborder les effets cérébraux du stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA, les principales enzymes responsables du stress oxydatif/nitrosatif et les moyens cellulaires de défense seront brièvement décrits dans la section suivante.

4.3.1 Sources du stress oxydatif/nitrosatif

Dans les conditions physiologiques, les ROS et les RNS sont produits en faible quantité par la chaîne respiratoire mitochondriale, la monoamine oxydase, la NADPH oxydase et les enzymes de synthèse de l'oxyde nitrique (NOS) (Siegel *et al.*, 1989). En particulier, la famille des NOS, qui catalyse la formation de NO à partir de L-arginine, est constituée de trois isoformes : NOSe et NOSn qui sont exprimés de façon constitutive respectivement par les cellules endothéliales et les neurones, et NOSi qui est inductible et

exprimé par les macrophages, la microglie activée et les astrocytes réactifs (Guix *et al.*, 2005). L'isoforme NOS_i est induit notamment par les cytokines pro-inflammatoires *via* la voie de signalisation NF- κ B (Marks-Konczalik *et al.*, 1998). À la différence du NO produit en faible quantité par NOS_e et NOS_n, qui agit en tant que vasodilatateur et neuromodulateur, le NO produit en grande quantité par NOS_i a des propriétés microbicides et peut entraîner des dommages cellulaires (Guix *et al.*, 2005). La présence excessive de ROS et RNS entraîne notamment des dommages de l'ADN et des protéines, et la peroxydation des lipides membranaires.

4.3.2 Défense anti-oxydante cérébrale

Le cerveau est doté d'un système enzymatique et non-enzymatique de défense anti-oxydante. Le système enzymatique est constitué de la superoxyde dismutase, de la catalase, des enzymes du glutathion et de l'hème oxygénase (HO). En particulier, l'HO regroupe deux isoformes : HO-2 qui est constitutivement exprimée par tous les types cellulaires cérébraux, et HO-1 qui est inductible par les cytokines pro-inflammatoires et est principalement exprimée par la microglie activée et les astrocytes réactifs (Vargas and Johnson 2009). HO-1 catalyse la dégradation de l'hème pour former *in fine* la bilirubine, un puissant anti-oxydant. D'autre part, le GSH joue un rôle central dans la défense anti-oxydante enzymatique et non-enzymatique (Dringen *et al.*, 2000). Ce tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine), synthétisé essentiellement par les astrocytes, est à la fois un cofacteur des enzymes du glutathion et un accepteur direct des radicaux libres. L'induction de HO-1 et la diminution des réserves cérébrales de GSH constituent deux marqueurs caractéristiques de stress oxydatif/nitrosatif.

4.3.3 Le stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA

Les causes précises du stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA ne sont pas clairement établies mais il existe des évidences indirectes qui suggèrent que l'ammoniaque joue un rôle important. En effet chez l'animal, l'infusion intraveineuse d'ammoniaque induit une augmentation des ROS (Kosenko *et al.*, 2003) et de la peroxydation lipidique cérébrale (O'Connor and Costell 1990), et s'accompagne d'une déplétion des stocks cérébraux de GSH ainsi que d'une diminution de l'expression des enzymes cérébrales de la défense anti-oxydante (Kosenko *et al.*, 1997). D'autre part, l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque conduit à la production de ROS, l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale, la diminution du contenu astrocytaire en GSH, ainsi que l'augmentation de l'oxydation des ARN, de la peroxydation lipidique et de la nitration des protéines (Murthy *et al.*, 2001).

Plus récemment, il a été démontré que l'administration de NAC retarde la progression de l'EH et prévient la déplétion des stocks cérébraux de GSH limitant ainsi les effets du stress oxydatif/nitrosatif chez la souris traitée à l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010a). D'autre part, les cytokines pro-inflammatoires semblent également jouer un rôle dans le stress oxydatif/nitrosatif cérébral puisque l'injection de minocycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines qui inhibe l'activation microgliale, retarde la progression de l'EH, diminue à la fois l'activation de la microglie, l'expression cérébrale des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6, l'expression cérébrale de NOSi, NOSe et HO-1, et réduit les niveaux cérébraux de nitrites/nitrates chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009b; Jiang *et al.*, 2009c). De plus, l'exposition d'astrocytes en culture à un milieu conditionné provenant de cellules microgliales en culture traitées à l'ammoniaque induit un gonflement astrocytaire, et l'ajout d'un chélateur de superoxyde ou

de peroxy-nitrite dans ce milieu conditionné diminue le gonflement. Ces résultats indiquent que la microglie contribue au gonflement astrocytaire par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant le stress oxydatif/nitrique (Rao *et al.*, 2012). Enfin, l'exposition d'astrocytes en culture à un cocktail de cytokines pro-inflammatoires induit un gonflement cellulaire plus important lorsque les astrocytes en culture sont prétraités à l'ammoniaque (Rama Rao *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats démontre que la microglie contribue au gonflement astrocytaire lors d'IHA *via* des mécanismes impliquant le stress oxydatif/nitrosatif et les cytokines pro-inflammatoires.

Enfin, il a été démontré que l'exposition d'astrocytes en culture à des conditions hypo-osmotiques, comme c'est le cas lors d'IHA puisque l'augmentation des concentrations cérébrales en ammoniaque induit un flux d'eau de la périphérie vers le compartiment extracellulaire cérébral, induit le gonflement cellulaire, la production de ROS/RNS et la nitration protéique (Schliess *et al.*, 2004). Cette étude démontre donc que le gonflement astrocytaire peut induire le stress oxydatif/nitrosatif ce qui suggère la présence d'un cercle vicieux, le stress oxydatif/nitrosatif et le gonflement cellulaire s'entretenant mutuellement par le biais de mécanismes physiopathologiques complémentaires.

4.4 Le volume cérébral lors d'IHA

L'œdème cérébral et l'augmentation de la PIC sont les deux conséquences les plus dangereuses lors d'IHA et environ 80% des patients développent un œdème cérébral au stade 4 de l'EH (Jalan 2003; Munoz 1993; Raschke *et al.*, 2008). L'œdème cérébral se définit comme une augmentation du volume du cerveau résultant de l'accumulation anormale localisée ou diffuse de fluide dans le parenchyme cérébral (Klatzo 1967). L'accumulation de fluide peut se faire au niveau extra- ou intracellulaire ce qui définit deux

types d'œdèmes : l'œdème vasogénique ou l'œdème cytotoxique (Klatzo 1994). Les mécanismes physiopathologiques impliqués reposent sur le maintien ou non de l'intégrité de la BHE. Comme nous l'avons mentionné plus haut, des études en microscopie électronique et d'imagerie par résonance magnétique démontrent que lors d'IHA, l'œdème cérébral est de nature cytotoxique puisque le gonflement cellulaire est localisé au niveau des astrocytes et que la BHE reste anatomiquement intacte à la fois chez l'homme et dans les modèles animaux (Chavarria *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 1992; Ranjan *et al.*, 2005). L'œdème cytotoxique lors d'IHA entraîne une augmentation du volume du parenchyme cérébral et s'accompagne de perturbations hémodynamiques du flux sanguin cérébral qui peuvent entraîner une augmentation de la PIC, une hypoperfusion cérébrale, l'engagement cérébral et la mort.

Le fait que la GS soit principalement astrocytaire et constitue la principale voie de détoxification de l'ammoniaque dans le cerveau semble être impliqué dans le gonflement spécifique des astrocytes lors d'une IHA. En effet, l'accumulation astrocytaire de glutamine, aux propriétés osmotiques, entraîne une entrée d'eau et le gonflement des astrocytes qui résulte *in fine* en l'apparition d'un œdème cérébral. Cette hypothèse est supportée par le fait que les concentrations cérébrales en glutamine sont augmentées lors d'IHA chez les patients (Record *et al.*, 1976) et dans les modèles animaux (Mans *et al.*, 1994; Swain *et al.*, 1992). Cependant, les taux cérébraux de glutamine ne sont pas corrélés à la progression de l'EH ni à la survenue du coma hépatique (Michalak *et al.*, 1996) ce qui suggère que d'autres facteurs sont impliqués dans le gonflement astrocytaire. En particulier, les aquaporines (AQP) sont des canaux permettant le passage de l'eau qui jouent un rôle essentiel dans la régulation du volume cellulaire et par conséquent dans l'homéostasie du volume cérébral. Parmi les isoformes des AQP, l'AQP-4 est principalement exprimée dans

le parenchyme cérébral et notamment au niveau des pieds des astrocytes périvasculaires (Nielsen *et al.*, 1997). Plusieurs études démontrent que l'AQP-4 contribue au développement de l'œdème cérébral dans divers traumatismes cérébraux (Papadopoulos and Verkman 2007) et l'expression de l'AQP-4 est augmentée lors d'IHA expérimentale (Eefsen *et al.*, 2010; Margulies *et al.*, 1999; Rama Rao *et al.*, 2010) et dans des astrocytes en culture exposés à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque (Rama Rao *et al.*, 2003). D'autre part chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique, la diminution de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un filament intermédiaire impliqué dans les propriétés viscoélastiques des astrocytes, suggère un rôle important de cette protéine dans la régulation du volume cellulaire et dans la pathogenèse de l'œdème cérébral lors d'IHA (Belanger *et al.*, 2002).

4.5 Le métabolisme énergétique cérébral lors d'IHA

Le métabolisme énergétique cérébral est perturbé lors d'IHA et des études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'ammoniaque inhibe certaines enzymes du cycle de Krebs et du métabolisme oxydatif ce qui se traduit par une diminution de l'oxydation du glucose et par une augmentation de la glycolyse (Lai and Cooper 1986; Ott *et al.*, 2005; Rama Rao and Norenberg 2012). Une augmentation des concentrations cérébrales en lactate est retrouvée chez les patients atteints d'IHA et est corrélée à l'augmentation de la PIC (Ott *et al.*, 2005; Rama Rao and Norenberg 2012). Chez le rat avec une dévascularisation hépatique, des expériences de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire révèlent une synthèse *de novo* du lactate cérébral qui est corrélée à la progression de l'EH et à l'apparition de l'œdème cérébral lors d'IHA (Zwingmann *et al.*, 2003). D'autre part, l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques de lactate conduit à un

gonflement cellulaire et à la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 dans des co-cultures d'astrocytes et de microglie (Andersson *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 1990). Lors d'IHA, lactate joue donc un rôle osmotique et inflammatoire dans la physiopathologie de l'EH et de l'œdème cérébral.

5. Les traitements de l'insuffisance hépatique aiguë

5.1 La transplantation hépatique

La transplantation hépatique orthotopique est la seule option définitive pour les patients atteints d'IHA dont la perte d'hépatocytes est si massive que le foie ne peut pas se régénérer et ne peut pas maintenir la vie. La transplantation hépatique réalisée lors d'IHA représente 5 à 12% des transplantations du foie toutes causes confondues, et le taux de survie associé est de 75 à 90% (Farmer *et al.*, 2003; O'Grady 2005). D'autres alternatives sont également disponibles telles que la greffe d'une portion de foie d'une personne vivante ou la transplantation de foie auxiliaire, qui consiste en la résection du foie malade associée à une greffe de foie et en l'arrêt du traitement immunosuppresseur lorsque la régénération du foie natif *in situ* est complète (Campsen *et al.*, 2008; Chenard-Neu *et al.*, 1996).

5.2 Les thérapies visant à diminuer les niveaux plasmatiques d'ammoniaque

5.2.1 L-ornithine L-aspartate (LOLA)

LOLA est un mélange des acides aminés L-ornithine et L-aspartate qui réduit l'hyperammonémie en augmentant la détoxification de l'ammoniaque par le muscle squelettique. Son administration est associée à une diminution de la sévérité de l'EH dans les modèles expérimentaux d'IHA (Rose *et al.*, 1999). Cependant chez les patients atteints

d'IHA, un rebond d'hyperammonémie dû à la glutaminase, exprimée par différents organes, a été mis en évidence lors d'un traitement avec LOLA (Jalan and Lee 2009) et son utilisation n'est pas associée à une diminution de l'hyperammonémie ni à une amélioration du taux de survie (Acharya *et al.*, 2009).

5.2.2 *L-ornithine phénylacétate (OP)*

L'OP est un sel formé de L-ornithine et de phénylacétate qui, comme le traitement LOLA, a pour but de réduire l'hyperammonémie en augmentant la détoxification de l'ammoniaque par le muscle squelettique. Ce composé permet *in fine* l'élimination de l'ammoniaque sous forme de phénylacétylglutamine, qui est alors excrétée dans les urines (Jalan *et al.*, 2007). A la différence de LOLA, aucun phénomène de rebond d'hyperammonémie n'est observé lors d'un traitement avec l'OP car il n'existe pas d'enzyme endogène capable d'hydrolyser la phénylacétylglutamine. Son administration est associée à une diminution de l'hyperammonémie et de la PIC chez le porc ayant subi une dévascularisation hépatique (Ytrebo *et al.*, 2009), et des études sont actuellement conduites chez l'homme pour évaluer son innocuité et son efficacité thérapeutique.

5.3 Les stratégies osmotiques visant à diminuer l'œdème cérébral

5.3.1 *Le mannitol*

Le mannitol est un agent diurétique avec des propriétés osmotiques. L'injection intraveineuse de mannitol est la stratégie thérapeutique conventionnelle lors d'IHA et elle vise à induire un état hyperosmotique en périphérie, créant ainsi un gradient de concentration de part et d'autre de la BHE et forçant la sortie d'eau du compartiment cérébral vers la circulation générale (Larsen and Wendon 2008). Cependant, une attention

particulière doit être portée car le mannitol, en tant qu'agent diurétique, peut entraîner une hypotension et une insuffisance rénale.

5.3.2 La saline hypertonique

La saline hypertonique (30%) peut être administrée en intraveineuse chez les patients atteints d'IHA en alternative du mannitol. Une étude clinique démontre que la PIC et l'incidence de l'hypertension intracrânienne sont significativement réduites par la saline hypertonique en comparaison des patients ayant reçu des soins standards (Murphy *et al.*, 2004).

5.4 Les stratégies visant à diminuer l'inflammation systémique

5.4.1 Les antibiotiques

Les patients atteints d'IHA sont particulièrement sensibles aux infections compte tenu de leur état immunologique et des soins invasifs que leur condition requiert. De plus, la présence d'une infection augmente le risque de développer un SIRS et par conséquent de précipiter la progression de l'EH (Rolando *et al.*, 2000; Vaquero *et al.*, 2003). Administrée par voie entérale ou parentérale, l'antibiothérapie est le plus souvent composée de deux antibiotiques dirigés contre les bactéries Gram positives et Gram négatives, et les associations les plus fréquentes sont la flucloxacilline/gentamicine, la flucloxacilline/ceftazidime, la piperacilline/gentamicine et la ceftazidime/amoxicilline (Rolando *et al.*, 1993; Rolando *et al.*, 2000).

Bien que l'administration prophylactique d'antibiotiques à large spectre ne fasse pas actuellement l'objet de recommandations particulières, il a cependant été démontré qu'elle est associée à une diminution de la fréquence des infections lors d'IHA, ce qui suggère que

les antibiotiques administrés en prophylaxie diminuent l'incidence de l'augmentation de la PIC (Rolando *et al.*, 1993). D'autre part, l'administration de minocycline chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique diminue la signalisation pro-inflammatoire cérébrale (Jiang *et al.*, 2009b), impliquée dans les complications neurologiques lors d'IHA, ce qui conforte le fait que les antibiotiques administrés en prophylaxie pourraient contribuer à la prévention de l'EH et de l'œdème cérébral. Des études cliniques doivent cependant confirmer cette observation expérimentale.

5.4.2 L'hépatectomie

L'hépatectomie pratiquée chez les patients en attente de transplantation hépatique, en l'absence de greffe disponible, demeure une condition exceptionnelle mais néanmoins vitale dans le cas où la déficience hépatique se détériore en dépit de l'ensemble des soins disponibles apporté. Dans une étude clinique menée sur 32 patients atteints d'IHA, il a été démontré que l'hépatectomie permet de stabiliser l'état hémodynamique cérébral et périphérique chez 60% des patients, qui seront transplantés ultérieurement avec succès (Ringe *et al.*, 1993). Enfin dans un cas clinique d'IHA causée par une surdose d'acétaminophène, une diminution de la PIC après l'hépatectomie, accompagnée d'une forte diminution des concentrations plasmatiques en cytokines pro-inflammatoires ont été démontrées, confirmant que l'inflammation originaire du foie nécrotique joue un rôle majeur dans les complications neurologiques lors d'IHA (Jalan *et al.*, 2002).

5.5 N-acétylcystéine (NAC)

Le NAC, un antioxydant puissant, est couramment administré chez les patients atteints d'IHA consécutive à une surdose d'acétaminophène. Il permet de compenser la

perte du stock hépatique en GSH et de limiter l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène (Heard 2008). D'autre part, des études cliniques démontrent que l'administration intraveineuse de NAC augmente les taux de survie chez des patients atteints d'IHA, non consécutive à l'acétaminophène, aux stades 3-4 d'EH (Mumtaz *et al.*, 2009).

5.6 Foie artificiel

Les stratégies artificielles de remplacement du foie sont des systèmes d'assistance hépatique extracorporelle. La détoxification est basée sur le principe de la dialyse et vise à éliminer les substances périphériques potentiellement dangereuses. Actuellement, le système le plus étudié lors d'IHA est le MARS (« molecular adsorbent recirculating system ») et il a été démontré que son utilisation augmente le taux de survie, diminue l'incidence de la transplantation hépatique et diminue le taux de mortalité associé à l'herniation cérébrale (Kantola *et al.*, 2008; Pugliese *et al.*, 2007). Des études complémentaires, en particulier sur de plus grandes populations de patients atteints d'IHA, sont cependant nécessaires pour démontrer l'efficacité thérapeutique du système MARS.

5.7 L'hypothermie

L'hypothermie modérée (32-35°C) est une technique utilisée chez les patients atteints d'IHA et plusieurs études cliniques démontrent des effets protecteurs de l'hypothermie au niveau des fonctions cérébrales et hépatiques (Vaquero 2012). En particulier, l'hypothermie entraîne une diminution de la PIC, une réduction du flux sanguin cérébral, une diminution des concentrations plasmatiques en ammoniacque et limite la progression de l'EH et de la pathologie hépatique (Jalan *et al.*, 1999; Jalan *et al.*, 2001). Dans les modèles expérimentaux, il a également été démontré que l'hypothermie diminue

l'atteinte hépatique (Bemeur *et al.*, 2010c; Vaquero *et al.*, 2007), réduit les concentrations cérébrales en ammoniacque (Belanger *et al.*, 2006) et améliore le métabolisme énergétique cérébral (Barba *et al.*, 2008; Chatauret *et al.*, 2001; Chatauret *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2000). Du point de vue de l'inflammation, l'hypothermie réduit notamment les concentrations plasmatiques et cérébrales en TNF- α , IL-1 β et IL-6 et diminue les marqueurs plasmatiques du stress oxydatif/nitrosatif à la fois chez les patients atteints d'IHA (Jalan *et al.*, 2004), et dans les modèles expérimentaux chez le rat dévascularisé (Jiang *et al.*, 2009a; Jiang *et al.*, 2009d; Sawara *et al.*, 2009) et chez la souris traitée à l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010c).

6. Buts de l'étude

Le projet a pour but d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes physiopathologiques inflammatoires de l'IHA et d'établir des approches thérapeutiques susceptibles de retarder les complications neurologiques qui mènent au coma hépatique chez la souris traitée à l'AOM.

Les mécanismes physiopathologiques responsables de l'EH et de l'œdème cérébral ne sont pas précisément décrits, mais l'ammoniaque libéré par le foie nécrotique, et l'astrocyte, l'unité cellulaire qui subit un gonflement, jouent un rôle majeur. D'autre part, les études actuelles démontrent que les cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées dans la physiopathologie de l'IHA, cependant leurs rôles en périphérie et au niveau cérébral restent encore à clarifier.

Les objectifs poursuivis sont les suivants :

1. étudier les effets de l'ammoniaque et de l'IL-1 β sur des astrocytes en culture au niveau du stress oxydatif/nitrosatif et des fonctions astrocytaires
2. établir le lien entre l'activation de la microglie, les taux de cytokines pro-inflammatoires cérébrales et le développement des complications neurologiques associées à l'IHA
3. démontrer que des agents anti-inflammatoires peuvent retarder la progression des complications neurologiques lors d'IHA
4. démontrer qu'une infection surimposée à l'IHA précipite l'EH et mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques impliqués au niveau de la BHE.

CHAPITRE 2 :
PRÉSENTATION DES ARTICLES

Premier article :

**Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha
play a major role in the progression of acute liver failure
and its neurological complications**

PLoS ONE 2012; 7(11): e49670. doi:10.1371/journal.pone.0049670

Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications

Anne Chastre^a, Mireille Bélanger^a, Elizabeth Beauchesne^a, Bich N. Nguyen^b,
Paul Desjardins^a, and Roger F. Butterworth^{a*}

^aNeuroscience Research Unit, Hôpital Saint-Luc, CRCHUM, Montreal, Canada

^bDépartement de pathologie, Hôpital Saint-Luc, CHUM, Montreal, Canada

*Corresponding Author:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Neuroscience Research Unit
CHUM, Campus Saint-Luc

Université de Montréal

1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec, Canada
H2X 3J4

Phone: (514) 890-8000 Ext. 35759

Fax: (514) 412-7253

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article

Anne Chastre a réalisé les plans expérimentaux et exécuté la majorité des expériences ainsi que l'analyse des données. Le Dr. Beauchesne a contribué aux expériences d'immunohistochimie et le Dr. Bélanger à celles de mesure du stress oxydatif/nitrosatif. Le Dr. Nguyen a réalisé l'analyse histopathologique des foies. Anne Chastre a rédigé la totalité du manuscrit. Les Drs. Bélanger, Desjardins et Butterworth ont participé à la correction du manuscrit.

Abstract

Background/aims: Acute liver failure (ALF) due to ischemic or toxic liver injury is a clinical condition that results from massive loss of hepatocytes and may lead to hepatic encephalopathy (HE), a serious neuropsychiatric complication. Although increased expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver, plasma and brain has been observed, conflicting results exist concerning its roles in drug-induced liver injury and on the progression of HE. The present study aimed to investigate the therapeutic value of etanercept, a TNF- α neutralizing molecule, on the progression of liver injury and HE in mice with ALF resulting from azoxymethane (AOM) hepatotoxicity.

Methods/Principal Findings: Mice were administered saline or etanercept (10 mg/kg; i.p.) 30 minutes prior to, or up to 6 h after AOM. Etanercept-treated ALF mice were sacrificed in parallel with vehicle-treated comatose ALF mice and controls. AOM induced severe hepatic necrosis, leading to HE, and etanercept administered prior or up to 3 h after AOM significantly delayed the onset of coma stages of HE. Etanercept pretreatment attenuated AOM-induced liver injury, as assessed by histological examination, plasma ammonia and transaminase levels, and by hepatic glutathione content. Peripheral inflammation was significantly reduced by etanercept as shown by decreased plasma IL-6 (4.1-fold; $p < 0.001$) and CD40L levels (3.7-fold; $p < 0.001$) compared to saline-treated ALF mice. Etanercept also decreased IL-6 levels in brain (1.2-fold; $p < 0.05$), attenuated microglial activation (assessed by OX-42 immunoreactivity), and increased brain glutathione concentrations.

Conclusions: These results indicate that systemic sequestration of TNF- α attenuates both peripheral and cerebral inflammation leading to delayed progression of liver disease and HE in mice with ALF due to toxic liver injury. These results suggest that etanercept may provide a novel therapeutic approach for the management of ALF patients awaiting liver transplantation.

Introduction

Acute liver failure (ALF) is a rare but life-threatening consequence of an abrupt loss of hepatic function in a patient with no previous history of liver disease. ALF may occur as a result of viral infections, liver ischemia, metabolic errors, exposure to drugs or hepatotoxins (acetaminophen, mushroom poisoning) or other unknown causes [1,2]. Although potentially reversible, it can lead to jaundice, hepatic encephalopathy (HE), coagulopathy, multiorgan failure and ultimately death within days. Mortality rates are high in patients with ALF ($\approx 80\%$) and, in cases where liver regeneration is absent or insufficient to maintain life, liver transplantation remains the only curative treatment option. However, one-third of ALF patients are not eligible for liver transplantation and one-fourth of the patients listed die while waiting for a transplant [3]. These facts underscore the importance of clarifying the pathophysiologic mechanisms of ALF and the urgent need to find therapies capable of delaying the progression of the disease.

Loss of liver function has detrimental effects on multiple organs, both due to the release of toxic factors from the injured liver and to the loss of key hepatic detoxifying pathways. ALF, in particular, is associated with serious neurological complications, including brain edema and HE, a neuropsychiatric disorder characterized by severe alteration of cognitive, psychiatric and motor disturbances ranging from alteration of consciousness to coma [4]. For decades, ammonia has been thought to play a major role in the pathogenesis of the neurological complications of ALF, but recent studies in patients and in animal models strongly suggest that inflammation, acting alone or in concert with ammonia, may also be involved [5].

Inflammation is an important feature of ALF and pro-inflammatory cytokine levels are elevated independently of the etiology of the underlying liver disease [6,7]. Among the pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a potent cytokine that exerts pleiotropic inflammatory and immunological functions by triggering synthesis of downstream targets such as interleukin-6 (IL-6) [8]. Levels of circulating TNF- α are increased in ALF patients and are associated with a poor prognosis [7,9]. Nevertheless, based on previous studies using TNF- α -lowering strategies, the precise role of TNF- α in toxic liver injury remains controversial. Neutralizing antibodies to TNF- α provide either only partial protection or are ineffective in preventing liver injury in mice administered hepatotoxic doses of acetaminophen and TNF- α knockout mice showed similar sensitivity to acetaminophen compared to wild type mice [10-12]. However, progression of HE is significantly delayed in azoxymethane-induced ALF mice lacking the TNF receptor [13].

Etanercept is a dimeric fusion protein consisting of two ligand-binding domains of the soluble human TNF receptor (sTNFR2) linked to the FC fragment of human immunoglobulin G1 (IgG1). It binds to TNF- α and renders it biologically unavailable and thus ineffective. Etanercept is currently used for the treatment of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis [14] and is effective in neutralizing TNF- α in animal models of traumatic brain injury [15], endotoxemia [16] and spinal cord injury [17], leading to improved outcomes.

In order to elucidate the role of TNF- α in toxic liver failure in mice, the protective effects of etanercept on the progression of liver injury and HE were investigated using a well-characterized model of ALF resulting from azoxymethane (AOM) hepatotoxicity.

Results of the present study indicate that administration of etanercept delays the progression of liver disease and HE by attenuating the peripheral and central inflammation characteristic of this model of ALF. This suggests that TNF- α plays a key role in toxic liver injury and that etanercept may provide a novel therapeutic approach for the management of ALF patients awaiting liver transplantation.

Materials and methods

Animals

All procedures involving animals were carried out in accordance to the Guidelines of the Canadian Council of Animal Care and protocols were approved by the Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (CHUM). Adult male C57BL6 mice (20-30 g) (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were maintained under controlled conditions of temperature and humidity, in a 12 h light/dark cycle, and supplied with standard laboratory chow and water *ad libitum*. All animals were free of infection at the onset of the experiment.

Animal treatments and experimental design

In a first set of experiments, the effects of AOM on the progression of liver dysfunction were studied over time. Mice received a single injection of AOM (100 µg/g; i.p.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA) dissolved in 100 µl saline as previously described [18]. Control mice received an equivalent volume of saline. Following AOM injection, body temperature was periodically monitored with a rectal probe and rigorously maintained in the range of 36.5-37.5°C using heating pads and lamps. Glycemia was monitored and kept at 5-7 mM by subcutaneous injections of dextrose 10%. Mice were sacrificed by decapitation at 3 h, 6 h, 9 h and 12 h following AOM injection and at coma stages of HE (defined as the loss of corneal reflex, occurs 18-20 h after AOM injection) after anesthesia with a ketamine/xylazine cocktail (50 and 9 mg/kg, respectively; i.p.). Plasma samples were immediately collected from the heart into heparinized tubes, centrifuged (10 min, 10 000 g) and kept at -70°C until use.

In a second set of experiments, the effect of etanercept on the progression of HE (time to coma) was investigated. Mice received a single injection of etanercept (10 mg/kg, i.p.) (Enbrel; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) or saline 30 min prior to, or 3 h or 6 h after administration of AOM (100 µg/g; i.p.). In preliminary experiments, non-specific human immunoglobulin G was chosen as a control vehicle and results showed that it worsens liver damage and precipitates the onset of coma stages (data not shown). Saline was therefore used as a control vehicle rather than human immunoglobulin G. Temperature and glycemia were carefully monitored in all animals as described above until the onset of coma stages of encephalopathy.

In a third set of experiments, the protective effects of etanercept were investigated on liver damage, oxidative stress markers in liver and brain, and microglial activation. Mice received a single injection of etanercept (10 mg/kg; i.p.) or saline 30 min prior to AOM (100 µg/g; i.p.). Temperature and glycemia were carefully monitored in all animals as described above. Etanercept-treated mice and control mice were sacrificed in parallel with saline-treated comatose AOM mice (loss of corneal reflex). Plasma samples were immediately collected from the heart into heparinized tubes, centrifuged (10 min, 10 000 g) and kept at -70°C. Brain (frontal cortex) and liver samples were collected and kept at -70°C until use.

Histological assessment of liver damage

Livers were fixed overnight by immersion in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded specimens were prepared and sections (6 µm) were mounted on Superfrost plus microscope slides (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). HPS (hematoxylin-phloxin-

saffron) staining was performed according to a standard protocol and liver pathology was assessed by an investigator who was blinded to the experimental treatment groups.

Biochemical assays

Plasma samples were diluted 10-fold in saline and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were assayed with an automated analyzer. Ammonia levels in plasma were determined using a commercial ammonia assay kit (Sigma-Aldrich) based on a colorimetric method using the glutamate dehydrogenase enzymatic reaction. The relative standard deviation of the kit was 1-2%. Samples were diluted 40-fold in assay diluent and absorbance was read at 340 nm.

Determination of reduced and oxidized glutathione

Total (GSH_t) and reduced (GSSG) glutathione were analyzed in liver and brain (cerebral cortex) using a colorimetric assay (Oxis International, Foster City, CA, USA). Briefly, tissue samples (25 mg) were homogenized in 10 volumes of ice cold 5% metaphosphoric acid. For GSSG determination, a volume of the thiol-scavenging reagent 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulfonate (M2VP) was quickly added to 4 volumes of homogenates. All samples (GSH_t and GSSG) were centrifuged (10 000 g, 15 min at 4°C). Supernatants were then diluted with assay buffer, loaded onto a microplate and mixed with equal volumes (50 µl) of DTNB chromogen (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), glutathione reductase and NADPH according to the manufacturer's protocol. Absorbance was monitored at 412 nm for 10 min. Total and oxidized glutathione were determined from standard curves. Results were expressed in µmoles per g wet weight. The GSH/GSSG ratio was calculated as $(\text{GSH}_t - 2\text{GSSG})/\text{GSSG}$.

IL-6 assays in plasma and brain

IL-6 levels were measured in plasma and brain using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit specific for mouse IL-6 (eBioscience, San Diego, CA, USA). Detection limit was 4 pg/mL. For plasma IL-6 measurements, samples were diluted 15-fold in assay diluent and incubated overnight at 4°C. For IL-6 measurements in brain, mice were transcardially perfused with saline and brains rapidly removed, flash frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C. Cerebral cortex was homogenized in 50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.5) containing a protein inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 12 000 g for 45 min. Protein concentrations were measured using a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cytosolic fractions were then diluted 5-fold in assay diluent and incubated overnight at 4°C. The plates were read at 450 nm and values at 570 nm were subtracted. Absorbance was converted to pg/ml using a standard curve prepared with recombinant mouse IL-6. For cerebral IL-6 measurements, levels were expressed in pg/mg of proteins.

TNF- α and CD40L measurement in plasma

Plasma TNF- α and CD40L were measured using specific ELISA kits (eBioscience) according to the manufacturer's protocol. Detection limits were 8 pg/ml for TNF- α and 0.14 ng/ml for CD40L. For TNF- α measurement, plasma samples were diluted 3-fold in assay diluent and incubated overnight at 4°C. The plate was read at 450 nm and values at 570 nm were subtracted. Absorbance was converted to pg/ml using a standard curve prepared with recombinant mouse TNF- α . For CD40L measurements, plasma was diluted 4-fold in assay diluent and incubated 2 h at room temperature. The plate was read at 450

nm and absorbance was then converted to pg/ml using a standard curve prepared with recombinant mouse CD40L.

Western blot analysis

Brain samples (frontal cortex) from AOM mice treated with etanercept were homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 12 000 g for 45 min. Protein concentrations were measured using a DC Bio-Rad protein assay kit. Proteins (120 µg) were solubilized in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol; 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 10% denaturing SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories). *Ponceau S staining* was used to *verify* equal loading. The membranes were blocked for 1 h in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% dry milk and 0.1% Tween 20, then incubated for 1 h with anti-human (Fc specific) IgG antibody coupled to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich; 1/25 000). After washing with TBS, peroxidase activity was detected by chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The lower limit of detection of etanercept (3.5 ng) was determined by mixing serial dilutions of etanercept with 120 µg of total protein extracted from frontal cortex of etanercept-treated mice (data not shown).

Immunohistochemistry

Mice were deeply anaesthetized with ketamine and xylazine and perfused transcardially with 100 ml ice-cold saline followed by 100 ml formalin (containing 4%

paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0). Brains were removed, post-fixed in 4% formalin at 4°C for 12 h and transferred into ice-cold PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM, KH₂PO₄; pH = 7.4) containing 0.09% sodium azide solution for storage. Free-floating 50 µm thick coronal sections were obtained using a vibratome and mounted on Superfrost Plus slides. Sections were incubated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 15 min to block endogenous peroxidase activity and with 10% rabbit serum and 0.2% Triton X-100 to block non-specific binding sites. Sections were then incubated at 4°C overnight with rat anti-mouse CD11b (OX-42) (1/100) (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA). After washing with PBS, sections were incubated for 1 h with rabbit anti-rat biotinylated secondary antibody (1/200) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and thereafter with Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories). OX-42 immunoreactivity was detected by incubation with 3-3'-diaminobenzidine containing urea-hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich). Sections were dehydrated stepwise in ethanol and xylene and mounted with Permount (Fisher Scientific). Sections in which the primary antibody was omitted were used as negative controls and showed no immunoreactivity.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean ± SEM and statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc analysis. A P value of less than 0.05 was considered to indicate a significant difference. Data were analyzed by using Prism 5.0 software (GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA).

Results

Circulating TNF- α and IL-6 increase before the onset of hepatic damage following AOM administration

Levels of circulating TNF- α and IL-6 over time were first evaluated following AOM administration. Plasma TNF- α levels were significantly increased 9 h after AOM injection (12.7-fold; $p < 0.001$) and remained at similar levels 12 h after AOM injection and at coma stages of encephalopathy (Table 1). Similarly, IL-6 levels were significantly increased 9 h following AOM treatment compared to control mice (691-fold; $p < 0.001$) and remained elevated until the onset of coma (Table 1). On the other hand, transaminase activities and plasma ammonia levels tended to increase during the progression of liver disease and reached statistical significance by the onset of coma. Compared to saline-treated controls, AST activity was increased by 17.6-fold ($p < 0.001$), ALT activity was increased by 88.8-fold ($p < 0.001$), and plasma ammonia levels were increased 6.7-fold ($p < 0.001$) at coma stages of encephalopathy (Table 1).

Table 1. Effect of azoxymethane (AOM) on plasma transaminase activities, ammonia, TNF- α and IL-6 levels over time.

	Control	3 h	6 h	9 h	12 h	Coma
AST (U/L)	176.7 \pm 31.8	275.0 \pm 65.1	303.3 \pm 65.7	792.5 \pm 207.1	1488 \pm 736.6	3113 \pm 380.3*
ALT (U/L)	53.3 \pm 3.3	57.5 \pm 4.8	104.0 \pm 24.3	120.0 \pm 12.2	312.8 \pm 96.2	4733 \pm 676.3*
Ammonia (μ M)	86.7 \pm 15.8	88.9 \pm 19.1	133.3 \pm 28.4	223.9 \pm 10.4	223.9 \pm 20.1	577.8 \pm 93.0*
TNF- α (pg/mL)	10.8 \pm 0.4	21.0 \pm 1.5	46.2 \pm 2.9	137.1 \pm 2.5*	143.7 \pm 11.09*	120.4 \pm 15.5*
IL-6 (pg/mL)	12.4 \pm 4.3	65.4 \pm 10.6	803.7 \pm 129.5	8568 \pm 1174*	6213 \pm 1266*	10609 \pm 653.1*

Table 1. Effect of azoxymethane (AOM) on plasma transaminase activities, ammonia, TNF- α and IL-6 levels over time. Mice ($n = 5$) were sacrificed at various time points indicated following AOM injection. * $p < 0.001$ vs. control by ANOVA.

Etanercept delays the progression of hepatic encephalopathy

The effects of etanercept administration on the progression of encephalopathy were next investigated. Following AOM administration, saline-treated mice as well as etanercept-treated mice developed HE progressing from lethargy and ataxia to loss of righting and corneal reflexes (coma stage). Saline-treated mice became comatose 19.3 ± 0.4 h following AOM injection whereas the onset of coma was significantly delayed in mice pretreated (-30 min) with etanercept (26.2 ± 1.7 h; $p < 0.001$) or injected with etanercept 3 h after AOM (25.8 ± 0.9 h; $p < 0.001$). The progression of encephalopathy in mice injected with etanercept 6 h after AOM treatment was not significantly different from saline-treated AOM mice (Fig. 1).

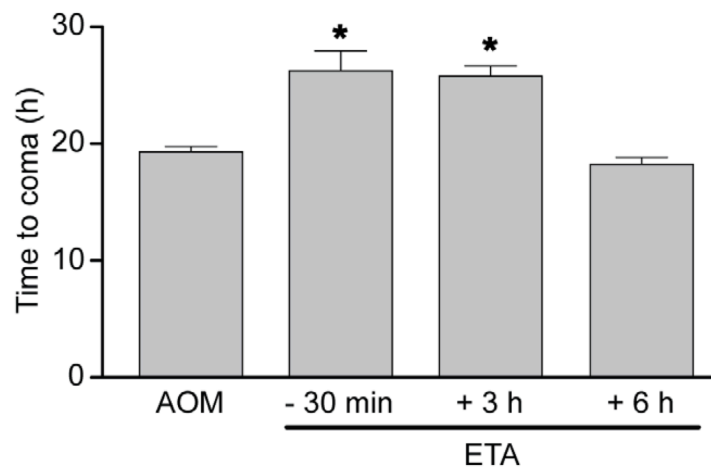


Figure 1. Etanercept significantly delays the progression of hepatic encephalopathy in mice with AOM-induced ALF. Time to coma (loss of corneal reflex) in ALF mice treated with etanercept (ETA) 30 min prior to, or 3 h and 6 h after AOM treatment. Data represent mean \pm SEM of $n = 6$ animals in each group. * $p < 0.001$ vs. Saline.

Etanercept treatment attenuates hepatocellular damage and normalizes plasma ammonia levels

AOM induced microvesicular steatosis with extensive degrees of necrosis and hemorrhagic congestion predominantly affecting midzonal and centrilobular regions, as previously reported [18] (Fig. 2). Etanercept pretreatment (-30 min) significantly attenuated hepatic necrosis and hemorrhagic congestion with concomitant decreases in AST (3.4-fold; $p < 0.001$) and ALT (9.5-fold; $p < 0.001$) plasma levels compared to saline-treated ALF mice. Etanercept treatment also reduced blood ammonia levels 3.9-fold ($p < 0.001$) to values comparable to those observed in saline-treated mice (Table 2). Interestingly, etanercept pretreatment (30 min) was also protective in mice with acetaminophen-induced liver damage as shown by improved liver histopathology, and significantly reduced levels of transaminases and ammonia 12 h post APAP injection (data not shown).

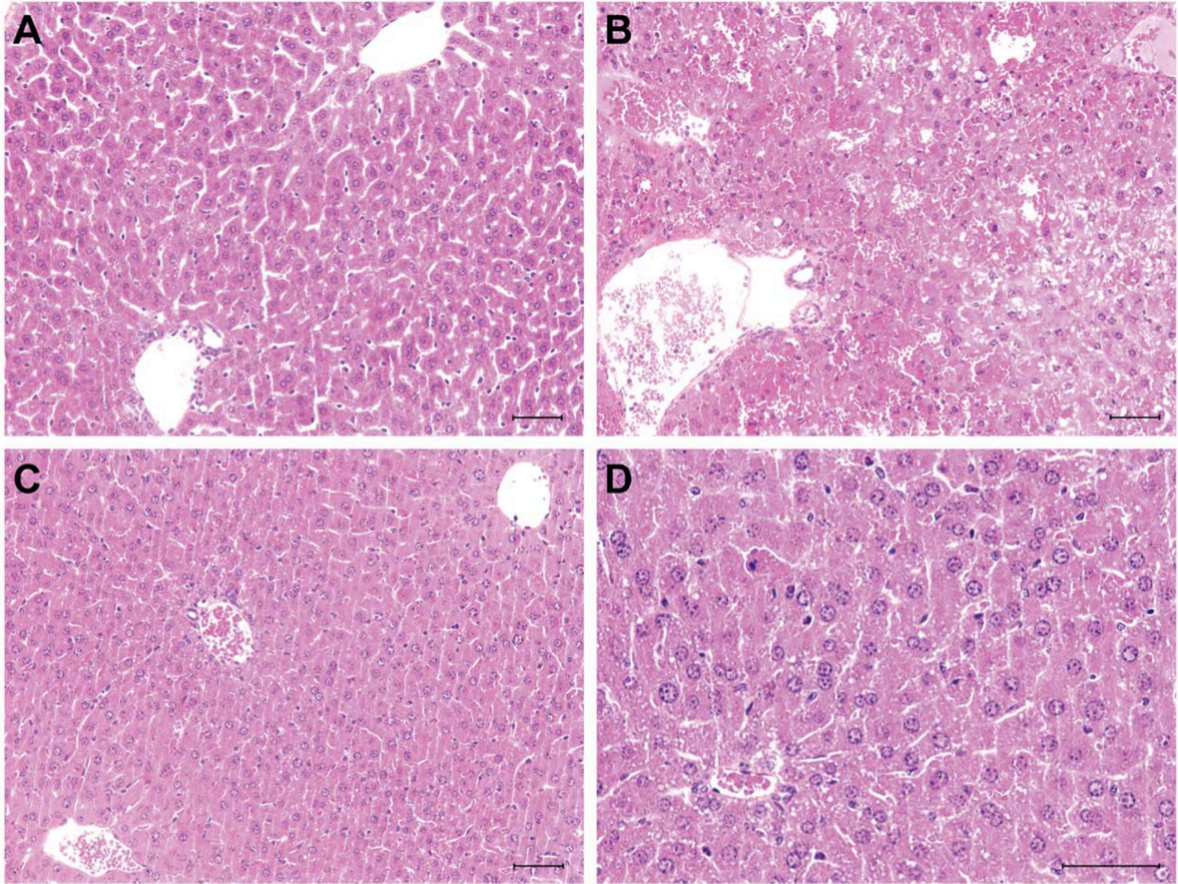


Figure 2. Etanercept attenuates liver damage in AOM-induced ALF mice. Etanercept was administered 30 min before AOM. Representative liver sections from saline-treated control mice (A), AOM-induced ALF comatose mice (B) and etanercept-treated ALF mice (C and D). ALF mice show areas of confluent hemorrhagic necrosis, microvesicular steatosis as well as sinusoidal dilatation and congestion. Note the presence of minor microvesicular steatosis with little necrosis and sinusoidal congestion following etanercept treatment. Representative pictures from n = 6 mice are shown. Scale bar : 50 μ m.

Table 2. Effects of etanercept on plasma transaminase activities and ammonia levels.

	Control	AOM-induced ALF	
		Vehicle-treated	Etanercept-treated
AST (U/L)	112.9±8.0	3674±306.5*	1093±190.1†
ALT (U/L)	64.5±3.9	3699±397.6*	390.0±74.8†
Ammonia (μM)	101.4±5.3	500.4±70.4*	129.5±12.0†

Table 2. Effects of etanercept on plasma transaminase activities and ammonia levels.

Mice were administered etanercept 30 min prior to azoxymethane (AOM) or saline (Vehicle). Control mice received only saline. Data represent mean ± SEM of n = 12 in each group. *p < 0.001 vs. Control; †p < 0.001 vs. Vehicle-treated.

Etanercept normalizes plasma TNF- α , IL-6 and CD40L levels

The effect of etanercept on systemic inflammation was investigated by measuring levels of the pro-inflammatory mediators TNF- α , IL-6 and CD40L. In addition to increases of TNF- α , significant increases in plasma IL-6 (732.5-fold; p < 0.001) (Fig. 3B) and CD40L (8.3-fold; p < 0.001) (Fig. 3C) were observed in AOM-treated mice at coma stages of encephalopathy. Compared to saline-treated AOM mice, etanercept-pretreated mice displayed significantly lower levels of plasma TNF- α (2.5-fold; p < 0.05), IL-6 (4.1-fold; p < 0.001) and CD40L (3.7-fold; p < 0.001).

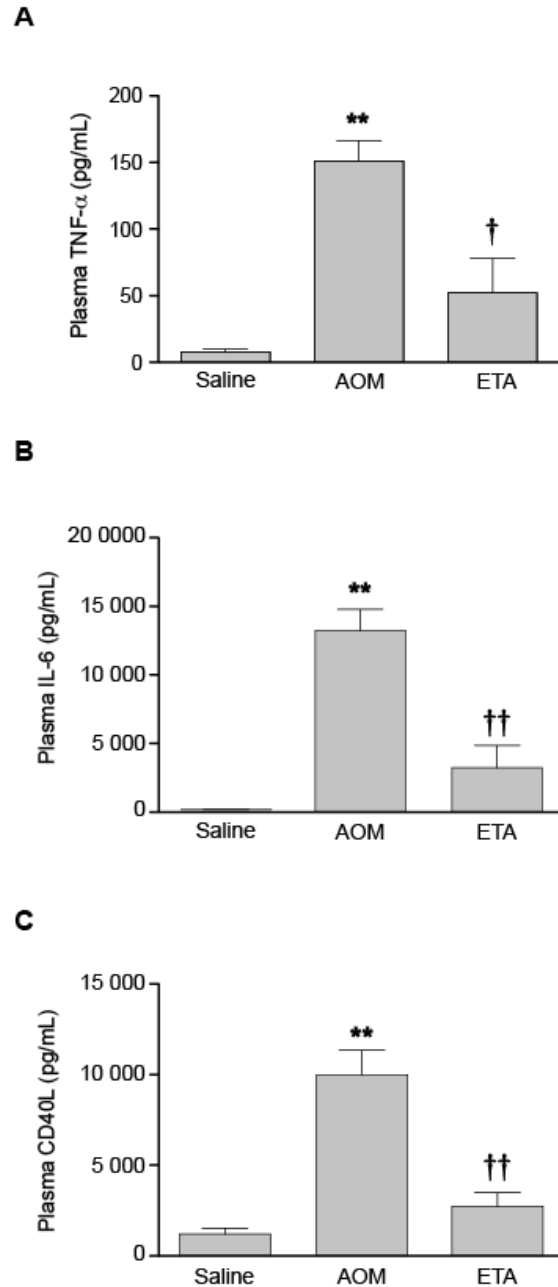


Figure 3. Etanercept treatment significantly attenuates plasma IL-6 and CD40L in AOM-induced ALF. Etanercept was administered 30 min before AOM. Plasma TNF- α (A), IL-6 (B) and CD40L (C) were quantified by ELISA. Data represent mean \pm SEM of n = 12 animals in each group for IL-6, and n = 6 for TNF- α and CD40L. **p < 0.001 vs. Saline; ††p < 0.001 vs. AOM; †p < 0.05 vs. AOM.

Etanercept attenuates cerebral IL-6 levels and microglial activation

Administration of AOM led to neuroinflammation as evidenced by a significant increase of brain IL-6 levels (1.8-fold; $p < 0.001$) compared to saline-treated controls, and treatment with etanercept significantly attenuated brain IL-6 levels induced by AOM (1.2-fold; $p < 0.05$) (Fig. 4A). On the other hand, OX-42 immunoreactivity (CD11b), a marker of activated microglia/macrophages, was significantly increased in the cerebral cortex of AOM mice at coma stages of encephalopathy whereas no immunoreactivity was detected in saline treated-controls (Fig. 4B). OX-42 immunoreactivity was significantly attenuated in AOM mice pretreated with etanercept.

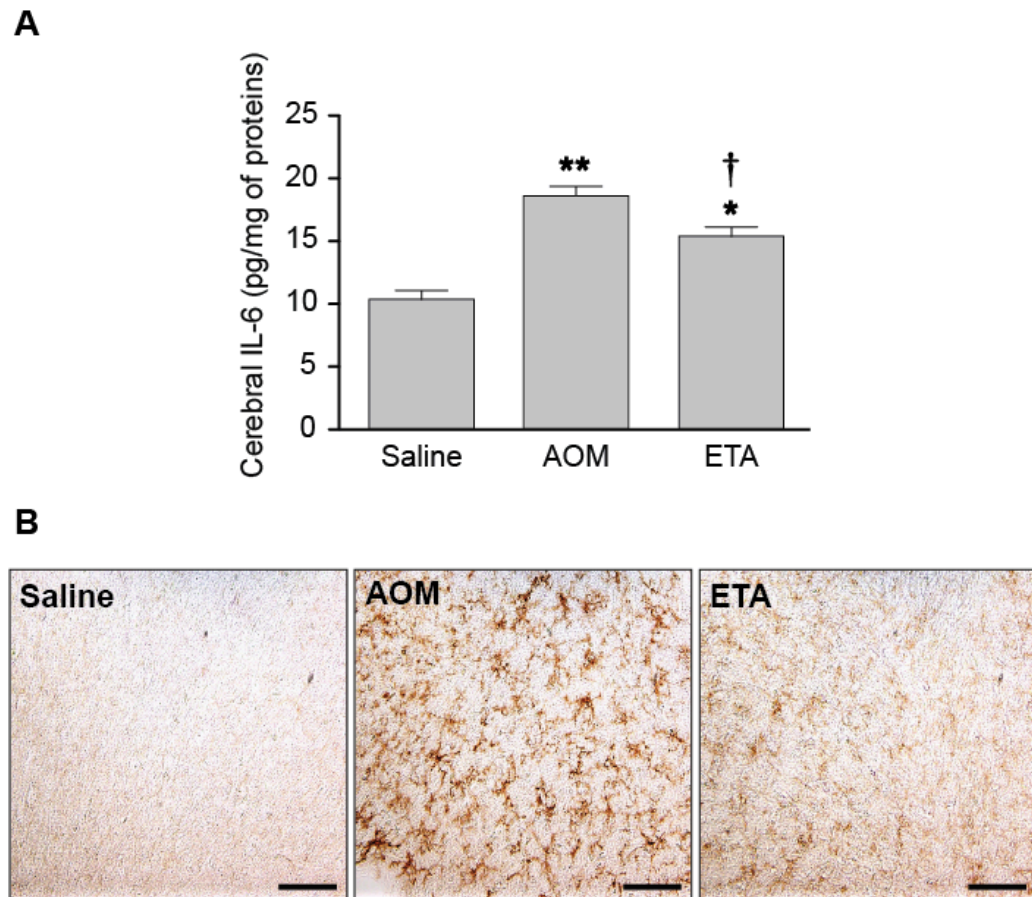


Figure 4. Etanercept treatment attenuates IL-6 levels and microglial activation in the brain of mice with ALF. Etanercept was administered 30 min before AOM. Brain IL-6 levels were measured in cytosolic fractions of cerebral cortex by ELISA (A). Data represent mean \pm SEM of $n = 6$ animals in each group. * $p < 0.01$ vs. Saline; ** $p < 0.001$ vs. Saline; † $p < 0.05$ vs. AOM. Representative micrographs showing the effect of ALF on OX-42 (CD11b) staining in cerebral cortex from saline-treated control, AOM-treated mice at coma stages of encephalopathy, and etanercept-treated ALF mice (B). Scale bar : 100 μm .

To assess whether the attenuating effects of etanercept on neuroinflammation were due to a local action following its entry into the brain or secondary to its peripheral effects, western blot analysis was performed to determine whether etanercept could be detected in the brain parenchyma following its administration in AOM mice. Cerebral cortex extracts

from perfused etanercept-treated AOM mice did not show detectable levels of etanercept (Fig. 5).

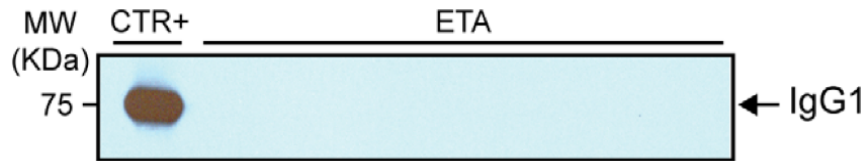


Figure 5. Western blot analysis of human IgG in the cerebral cortex of etanercept-treated AOM mice. Total homogenates of etanercept-treated AOM mice (ETA) were probed for the presence of etanercept using an antibody directed against human IgG (Fc fragment specific). A positive control (CTR+) was obtained by adding 150 ng of the 150 kDa etanercept recombinant molecule to the brain homogenate (lane 1) and shows that the antibody detects a 75 kDa band corresponding to the recombinant etanercept monomer after disruption of disulfide bridges (under denaturing conditions). No signal was detected in the cerebral cortex of etanercept-treated AOM mice (lanes 2-9).

Etanercept treatment attenuates oxidative stress in liver and brain

The protective effect of etanercept on oxidative stress, which is frequently associated with inflammation, was next investigated. At coma stages of encephalopathy, total hepatic glutathione stores (GSH_t) were significantly depleted in AOM-treated mice compared to saline-treated controls (2.3-fold; $p < 0.001$) and the reduced/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) was significantly decreased (3.75-fold; $p < 0.001$) (Fig. 6A and 6B). Etanercept treatment prevented the depletion of total hepatic glutathione content (1.8-fold; $p < 0.05$) and significantly increased the GSH/GSSG ratio (2-fold; $p < 0.05$). In brain, total glutathione levels of AOM mice at coma stages of encephalopathy were similar to those of saline-treated controls (Fig. 6C). However, the GSH/GSSG ratio was decreased

in brains of AOM mice compared to saline-treated controls (1.8-fold; $p < 0.05$) and significantly increased by etanercept treatment to values similar to those observed in saline-treated mice (1.6-fold; $p < 0.05$) (Fig. 6D).

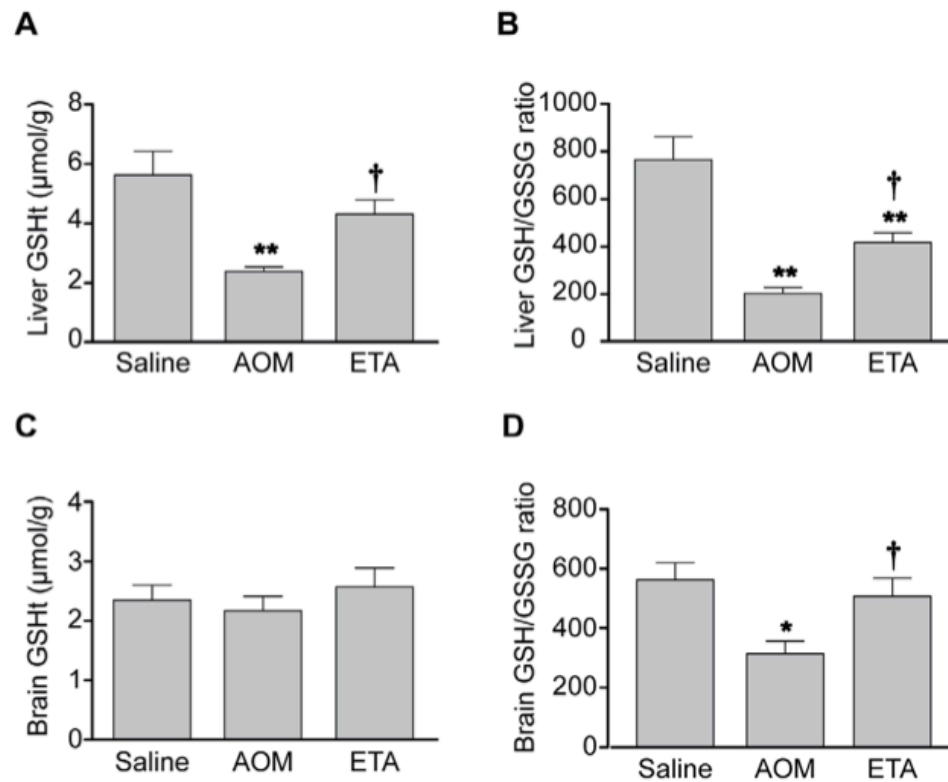


Figure 6. Etanercept treatment attenuates oxidative stress in liver and brain. Etanercept was administered 30 min before AOM. Total glutathione (GSH_t) and GSH/GSSG ratio were determined in liver (A and B, respectively) and brain (C and D, respectively). Data represent mean \pm SEM of $n = 6$ (liver), $n = 12$ (brain) and are expressed as $\mu\text{mol/g}$ wet weight (A and C). * $p < 0.05$ vs. Saline; ** $p < 0.001$ vs. Saline; † $p < 0.05$ vs. AOM.

Discussion

Findings of the present study indicate that TNF- α levels are increased early during AOM-induced ALF and that etanercept administration significantly delays the progression of HE by reducing hepatocellular damage, decreasing both systemic and central inflammation as well as hepatic and cerebral oxidative stress in these animals. These results add further support to the notion that TNF- α plays a major role in the pathogenesis of ALF.

TNF- α is a key cytokine that exerts pleiotropic effects ranging from proliferative responses, inflammatory effects and modulation of immune responses, to destructive cellular outcomes such as apoptotic and necrotic cell death. TNF- α is produced as a transmembrane (tmTNF- α) or a membrane-cleaved circulating cytokine (sTNF- α) by various cell types such as macrophages, lymphocytes, cerebral microglia and astrocytes, and hepatic Kupffer cells. It has been suggested that TNF- α plays a major role in the pathogenesis of HE associated with ALF where the circulating levels of this cytokine are significantly increased both in patients and animal models of ALF [19]. Moreover, a direct correlation has been established between TNF- α levels, severity of ALF and prognosis [7,9]. In the present study, plasma TNF- α levels reached statistical significance 9 h after AOM administration and clearly preceded the onset of coma and massive hepatocyte cell death which occurred only at coma stages of HE, as shown by large increases in ammonia and transaminase levels. These observations suggest that TNF- α plays a role early in the pathogenesis of AOM-induced ALF and HE. These findings are in accordance with other experimental models of ALF where elevated serum levels of TNF- α have been observed shortly after the initiating insult. For example, plasma TNF- α levels were increased as early

as 4 h following injection of a single dose of acetaminophen in mice and were correlated with the onset of hepatic damage [20].

TNF- α performs its biological functions as a homotrimer that binds to p55 and p75 TNF receptors (TNFR 1 and 2, respectively) and induces a variety of intracellular pathways regulating the transcription of a large number of genes implicated in host defence [21]. Importantly, TNF- α triggers within hours the secretion of multiple pro-inflammatory mediators among them IL-6 [8]. Results of the present study demonstrated that plasma IL-6 levels were significantly increased 9 h after AOM-induced hepatotoxicity and correlated with plasma TNF- α levels, which underscores the rapid pro-inflammatory effect of TNF- α and confirms the presence of systemic inflammation in the AOM model of ALF.

Systemic administration of etanercept has been shown to be effective in neutralizing TNF- α in various animal models of central nervous system injury, thus leading to improved outcomes [15,17]. Etanercept is a fusion protein of two TNFR2 extracellular domains linked to the Fc fragment of human immunoglobulin 1 (IgG1). It binds to a single sTNF- α trimer or tmTNF- α in a 1:1 ratio thereby acting as a competitive inhibitor of TNF- α [22,23]. Etanercept has a 50-fold greater affinity and is 1000-fold more efficient than the endogenous monomeric sTNF- α receptor as assessed *in vitro* by inhibition of TNF- α binding or bioactivity [16]. The half-life of etanercept *in vivo* is three days, which is five times that of monomeric sTNF- α receptor [24]. These characteristics, as well as the high volume of distribution of etanercept, result in a greater ability to neutralize the biologic effects of TNF- α , suggesting that it may be a suitable anti-TNF- α therapy in our model of ALF. Results of the present study show that systemic administration of etanercept 30 min

before or 3 h after AOM leads to delayed progression of HE and onset of coma as well as improved hepatic function. The protective effect of etanercept on AOM-induced liver damage was evidenced by reduced hepatocellular necrosis, microvesicular steatosis and hemorrhagic congestion, and by a preventive effect on the increases in plasma levels of ammonia and transaminases. Similar protective effects of etanercept were also observed in acetaminophen-induced liver injury, suggesting that the beneficial effects of etanercept are not specific to AOM-induced liver damage and that this drug may be useful in liver damage from various aetiologies.

Innate and adaptive immune responses occur during acute liver injury and are accompanied by the secretion of large amounts of pro-inflammatory cytokines [25,26]. In the present study, we focused on plasma IL-6 and CD40L, two pro-inflammatory mediators implicated in the inflammatory cascade mediated by TNF- α , in order to evaluate the biological effects of TNF- α inhibition. Etanercept administration prevented the increases of IL-6 and CD40L in mice with AOM-induced ALF confirming that the protective effects of etanercept are the consequence of the peripheral inhibition of the biological action of TNF- α . Importantly, previous studies have demonstrated the implication of these cytokines in the pathogenesis of ALF. Indeed, plasma IL-6 levels are significantly increased in patients with fulminant hepatitis and are indicative of a poor prognosis [27]. On the other hand, the dyad of the TNF family members CD40/CD40L is implicated in the inflammatory cascade that leads to ALF and induces the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 [28]. In liver, increased expression of CD40L and its receptor CD40 constitute an early mechanism for liver cell damage in both human and murine fulminant hepatic failure [29] and a recent study has demonstrated that overexpression of hepatic CD40L in mice

induces ALF [30]. Moreover, serum levels of CD40L are higher in patients with fulminant hepatitis than in patients with acute hepatitis or controls and are associated with a poor prognosis [31].

Interestingly, administration of etanercept 6 h after AOM treatment had no effect on the progression of HE, suggesting that the inflammatory cascade driven by TNF- α might already be too extensive at this stage to be reversed by etanercept. Indeed, although only a slight and non-significant increase in plasma TNF- α is observed 6 h after AOM administration, it is possible that the activation of Kupffer cells and the secondary recruitment of immune cells such as monocytes and neutrophils may already have led to an irreversible inflammatory response locally, accompanied by hepatocellular damage [32].

Oxidative stress is a component of the innate inflammatory response that develops as a consequence of injury. Our unit has previously demonstrated that oxidative stress plays a key role in the physiopathology of ALF in mice resulting from AOM hepatotoxicity, and that the protective effects of mild hypothermia or N-acetylcysteine in this model is mediated by an attenuation of plasma levels of pro-inflammatory cytokines, and a reduction of both the depletion of liver glutathione stores and of the GSH/GSSG ratio [33,34]. Results of the present study also demonstrate that systemic sequestration of TNF- α by etanercept attenuates the oxidative stress response associated with inflammatory pathways by preventing the depletion of liver glutathione stores and attenuating the decrease in hepatic GSH/GSSG ratio. Maintenance of hepatic glutathione stores thus appears to be an important mechanism by which peripheral inhibition of TNF- α prevents further hepatocellular damage.

Acute liver failure is frequently associated with serious neurological complications including HE and cerebral herniation. For decades, a great deal of attention has been focused on ammonia as the main agent responsible for the central nervous system complications of ALF. However, ammonia-lowering strategies are of limited value in preventing the cerebral complications of ALF [35,36] and recent studies strongly suggest that inflammation acting alone or in concert with ammonia plays an important role in the pathogenesis of HE [5,37]. Results of the present study demonstrated that systemic administration of etanercept also attenuated the neuroinflammatory response associated with AOM-induced ALF, as shown by lower cerebral IL-6 levels, attenuated microglial activation and a preserved GSH/GSSG ratio. Moreover, analysis of cerebral cortex extracts from etanercept-treated ALF mice failed to show the presence of significant amount of etanercept in the brain, suggesting that the 150 kDa recombinant complex does not cross the blood-brain barrier (BBB) following AOM administration and that BBB integrity was maintained. These results suggest that the beneficial effects of etanercept on HE in AOM-treated ALF mice are primarily mediated peripherally *via* an improvement of liver function. However, it cannot be excluded that etanercept is also acting indirectly by blocking the transduction of pro-inflammatory signalling to the brain. Immune-to-brain signalling can indeed occur *via* mechanisms such as i) entry of cytokines through brain regions lacking a functional BBB; ii) active cytokine transport at the BBB; iii) activation of brain endothelial cells resulting in release of second messengers into the brain; iv) signalling through afferent nerve fibres in the periphery; v) recruitment of activated immune cells into the brain parenchyma [38]. It is important to note that OX-42 is a marker of both activated microglia and macrophages, therefore it cannot be excluded that OX-42 positive cells may in part result from monocyte infiltration as shown in another model of liver damage [39].

Moreover, there is evidence that systemic pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α increase the permeability of cerebrovascular endothelial cells to ammonia [40] suggesting that beneficial effects of etanercept on neuroinflammation during ALF may also result from the prevention of an increase of BBB permeability to ammonia.

In conclusion, the present study demonstrates that TNF- α plays a key role in the pathogenesis of ALF and HE following AOM-induced hepatotoxicity in the mouse. Systemically administered etanercept delayed the onset and progression of HE by attenuating systemic inflammation and its deleterious consequences i.e hepatocellular damage, oxidative stress and neuroinflammation. These results suggest that etanercept has the potential to provide a promising therapeutic approach for the management of ALF in patients awaiting liver transplantation.

References

1. Ichai P, Samuel D (2008) Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 14 Suppl 2: S67-79.
2. Acharya SK, Batra Y, Hazari S, Choudhury V, Panda SK, et al. (2002) Etiopathogenesis of acute hepatic failure: Eastern versus Western countries. *J Gastroenterol Hepatol* 17 Suppl 3: S268-273.
3. Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH (2008) Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47: 1401-1415.
4. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, et al. (2002) Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35: 716-721.
5. Butterworth RF (2011) Neuroinflammation in acute liver failure: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Neurochem Int* 59: 830-836.
6. Koziel MJ (1999) Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 19: 157-169.
7. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, et al. (2000) Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 119: 446-460.
8. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, et al. (1996) The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 15: 1914-1923.

9. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, et al. (2000) High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 182: 1103-1108.
10. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI (1995) Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 133: 43-52.
11. Simpson KJ, Lukacs NW, McGregor AH, Harrison DJ, Strieter RM, et al. (2000) Inhibition of tumour necrosis factor alpha does not prevent experimental paracetamol-induced hepatic necrosis. *J Pathol* 190: 489-494.
12. Boess F, Bopst M, Althaus R, Polsky S, Cohen SD, et al. (1998) Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha gene knockout mice. *Hepatology* 27: 1021-1029.
13. Bemeur C, Qu H, Desjardins P, Butterworth RF (2010) IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 56: 213-215.
14. Kerensky TA, Gottlieb AB, Yaniv S, Au SC (2012) Etanercept: efficacy and safety for approved indications. *Expert Opin Drug Saf* 11: 121-139.
15. Chio CC, Lin JW, Chang MW, Wang CC, Kuo JR, et al. (2010) Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury. *J Neurochem* 115: 921-929.
16. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, et al. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151: 1548-1561.

17. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muia C, et al. (2006) Immunomodulatory effects of etanercept in an experimental model of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1006-1016.
18. Belanger M, Cote J, Butterworth RF (2006) Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem Int* 48: 434-440.
19. Odeh M (2007) Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur J Clin Invest* 37: 291-304.
20. Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, et al. (2006) Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 35: 62-68.
21. MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14: 477-492.
22. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117: 244-279.
23. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, et al. (2002) Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 418-426.
24. Alldred A (2001) Etanercept in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother* 2: 1137-1148.
25. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q (2010) Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 30: 782-794.

26. Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A (2007) Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis* 27: 339-350.
27. Izumi S, Hughes RD, Langley PG, Pernambuco JR, Williams R (1994) Extent of the acute phase response in fulminant hepatic failure. *Gut* 35: 982-986.
28. Chen K, Huang J, Gong W, Zhang L, Yu P, et al. (2006) CD40/CD40L dyad in the inflammatory and immune responses in the central nervous system. *Cell Mol Immunol* 3: 163-169.
29. Leifeld L, Trautwein C, Dumoulin FL, Manns MP, Sauerbruch T, et al. (1999) Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am J Pathol* 154: 1711-1720.
30. Schmitz V, Dombrowski F, Prieto J, Qian C, Diehl L, et al. (2006) Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure. *Hepatology* 44: 430-439.
31. Zheng YB, Gao ZL, Zhong F, Huang YS, Peng L, et al. (2008) Predictive value of serum-soluble CD154 in fulminant hepatic failure. *J Int Med Res* 36: 728-733.
32. Ito H, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Takemura M, et al. (2009) Role of TNF-alpha produced by nonantigen-specific cells in a fulminant hepatitis mouse model. *J Immunol* 182: 391-397.
33. Bemeur C, Desjardins P, Butterworth RF (2010) Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. *Metab Brain Dis* 25: 23-29.

34. Bemeur C, Vaquero J, Desjardins P, Butterworth RF (2010) N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Metab Brain Dis* 25: 241-249.
35. Jalan R (2005) Pathophysiological basis of therapy of raised intracranial pressure in acute liver failure. *Neurochem Int* 47: 78-83.
36. Acharya SK, Bhatia V, Sreenivas V, Khanal S, Panda SK (2009) Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 136: 2159-2168.
37. Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2010) Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 25: 17-21.
38. Capuron L, Miller AH (2011) Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 130: 226-238.
39. D'Mello C, Le T, Swain MG (2009) Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* 29: 2089-2102.
40. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM (1996) Effects of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med* 44: 474-482.

Deuxième article :

**Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases
blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure**

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article

Anne Chastre a réalisé les plans expérimentaux et exécuté la majorité des expériences ainsi que l'analyse des données. Le Dr. Bélanger a participé aux expériences de zymographie. Le Dr. Nguyen a réalisé l'analyse histopathologique des foies. Anne Chastre a rédigé la totalité du manuscrit. Les Drs. Bélanger et Butterworth ont participé à la correction du manuscrit.

Soumis à Liver International

**Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy
and increases blood-brain barrier permeability
in mice with acute liver failure**

Anne Chastre¹, Mireille Bélanger¹, Bich N. Nguyen² and Roger F. Butterworth^{1*}

¹Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital, CRCHUM, Montreal, Canada

²Department of pathology, Saint-Luc Hospital, CHUM, Montreal, Canada

*Corresponding Author:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Neuroscience Research Unit
CHUM, Campus Saint-Luc

Université de Montréal

1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec, Canada
H2X 3J4

Phone: (514) 890-8000 Ext. 35759

Fax: (514) 412-7253

Keywords: azoxymethane, endotoxemia, pro-inflammatory cytokines, matrix metalloproteinase-9, immunoglobulin G extravasation

List of Abbreviations: ALF, acute liver failure; HE, hepatic encephalopathy; CNS, central nervous system; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IL-6, interleukin-6; IL-1 β , interleukin-1beta; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; BBB, blood-brain barrier; TJs, tight junctions; ZO, zonula occludens; MMPs, matrix metalloproteinases; IgG, immunoglobulin G; AOM, azoxymethane; LPS, lipopolysaccharide; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

Financial support: This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research.

Abstract

Acute liver failure (ALF) is frequently complicated by infection leading to precipitation of central nervous system (CNS) complications, such as hepatic encephalopathy (HE), and increased mortality. There is evidence to suggest that when infection occurs in ALF patients, the resulting pro-inflammatory mechanisms may be amplified and in turn have a major impact on BBB function. The aim of the present study was therefore to investigate the role of endotoxemia on the progression of CNS complications in relation to BBB permeability during ALF.

Endotoxemia was induced by administration of lipopolysaccharide (LPS, 2 µg/kg, i.p.) to mice with ALF resulting from azoxymethane hepatotoxicity (AOM, 100 µg/g, i.p.). The effects of endotoxemia were investigated in relation to progression of HE, liver pathology, plasma ammonia and transaminases, peripheral and central pro-inflammatory cytokines and activity of cerebral matrix metalloproteinases. BBB permeability was assessed by measuring immunoglobulin G (IgG) extravasation and expression of BBB constitutive proteins.

LPS enhanced liver damage and accelerated progression to coma stages of HE in ALF mice compared to saline-treated ALF mice. The LPS challenge in ALF resulted in synergistic increases in peripheral and cerebral pro-inflammatory cytokines as well as in MMP-9 activity, which was accompanied by marked accumulation of IgG, consistent with a major increase of the BBB permeability. No changes in proteins constitutive of the BBB were observed in any of the treatment groups. These findings provide the first direct evidence that altered BBB permeability contributes to the pathogenesis of encephalopathy resulting from infections in ALF.

Introduction

Acute liver failure (ALF) is a life-threatening condition resulting from the abrupt loss of hepatic function in a patient without chronic liver disease (1). ALF is associated with metabolic and immunological disturbances that in turn may lead within days to peripheral and central complications such as coagulopathy, multiorgan failure, hepatic encephalopathy (HE), and intracranial hypertension and brain herniation. Mortality rates are high and up to 50% of patients with ALF die from brain herniation, which is known to arise through complex mechanisms involving multiple factors (2).

Ammonia plays a pivotal role in the pathogenesis of the central nervous system (CNS) complications of ALF (3). However, there is increasing evidence that other factors such as inflammation may also be involved in the course of ALF and its CNS complications. In favor of this, plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) are elevated both in ALF patients (4, 5) and in experimental models (6, 7). Moreover, TNF- α levels are correlated with the severity of liver disease and poor prognosis in these patients (8-10), and prospective studies have demonstrated that the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is found in about 60% of ALF patients and is associated with a worsening of HE and a poor prognosis (11, 12). Moreover, ALF patients are susceptible to infection, which, taken together result in an increased risk of developing a SIRS (13, 14).

The blood-brain barrier (BBB), which constitutes the interface between peripheral circulation and CNS, is formed by a monolayer of cerebrovascular endothelial cells that are closely sealed by tight junctions (TJ). These Tj are formed by various proteins such as the transmembrane occludin which is linked to the cytoplasmic scaffolding proteins zonula

occludens-1 and 2 (ZO-1 and ZO-2) (15). Together with astrocytes, pericytes and the basal lamina, the BBB maintains cerebral homeostasis by regulating the transport of molecules between the periphery and the brain. Electron microscopic studies demonstrate that BBB remains grossly intact in ALF patients, and it is generally accepted that there is no overt BBB breakdown in ALF (16-19). Nevertheless, the presence of subtle changes in BBB permeability as a result of altered TJ protein expression in ALF remains a matter of debate. In ALF mice resulting from azoxymethane (AOM) hepatotoxicity, contradictory results have been reported with regards to changes in the expression of TJ proteins and the presence of changes in BBB permeability (17, 20, 21). Interestingly, TNF- α was shown to downregulate occludin expression in ALF patients and mice with galactosamine-induced ALF (22). Moreover in experimental ALF, an upregulation in cerebral matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression was associated with an increase in BBB permeability (23), and TJ degradation was correlated with MMP-9 activity (20, 21) which is known to be regulated by pro-inflammatory cytokines (24). These studies suggest that peripheral pro-inflammatory cytokines may alter BBB integrity by modifying TJ expression and BBB permeability. Thus, in the presence of infection, large increases in pro-inflammatory signals, adding to those already present in ALF, may alter BBB function and contribute to the worsening of CNS complications observed in infected ALF patients.

The aim of the present study was to investigate the underlying pathological mechanisms by which infection may precipitate HE and in particular, its effect on BBB function. Endotoxemia was induced by injection of a low dose of lipopolysaccharide (LPS) in a well-characterized model of AOM-induced ALF in mice. Progression of HE was

assessed using a standardized neurological test paradigm as a function of serum ammonia, liver function, markers of peripheral and central inflammation, and BBB permeability.

Material and methods

Animals

Adult male C57BL6 mice (20-30 g) (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) were maintained in a 12 h light/dark cycle, and supplied with standard laboratory chow and water *ad libitum*. All animals were free of infection at the onset of the experiment. All procedures were carried out in accordance to the Guidelines of the Canadian Council of Animal Care and protocols were approved by the Animal Research Committee at Saint-Luc Hospital (CHUM).

Animal treatments and experimental design

ALF was induced by injection of AOM (100 µg/g; i.p.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA) dissolved in 100 µl saline as previously described (25). In order to mimic infection, mice received a single dose of LPS (2 µg/kg; i.p.) (*Escherichia coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich), dissolved in 100 µl saline 1 h after AOM injection. Five groups were constituted namely (1) Saline-treated normal mice (Control), (2) LPS-treated normal mice (LPS), (3) Saline-treated ALF mice (ALF-8h), (4) LPS-treated ALF mice at coma stages of HE (ALF+LPS), and (5) Saline-treated ALF mice at coma stages of HE (ALF-Coma). Saline, LPS and ALF-8h mice were pair-sacrificed when ALF+LPS mice reached coma stage of encephalopathy, which occurred on average 8.3 h following AOM administration (Fig. 1). LPS doses in the µg/kg range were chosen to induce non-lethal endotoxemia, as much higher doses (in the range of 1-25 mg/kg) are known to mimic sepsis in mice resulting in death of approximately half of animals (26). Following AOM injection, body temperature was carefully monitored with a rectal probe and rigorously maintained in the

range of 36.5-37.5°C using heating pads and lamps. Glycemia was monitored and kept at 5-7 mM by subcutaneous injections of 10% dextrose. Time to coma was determined by time to loss of corneal reflex. After anesthesia with a ketamine/xylazine cocktail (50 and 9 mg/kg, respectively; i.p.), plasma samples were immediately collected from the heart into heparinized tubes, centrifuged (10 min, 12 000 g) and kept at -70 °C. Mice were then transcardially perfused with saline. Brains were rapidly removed, flash frozen and kept at -70°C until use whereas livers were fixed overnight by immersion in 10% buffered formalin.

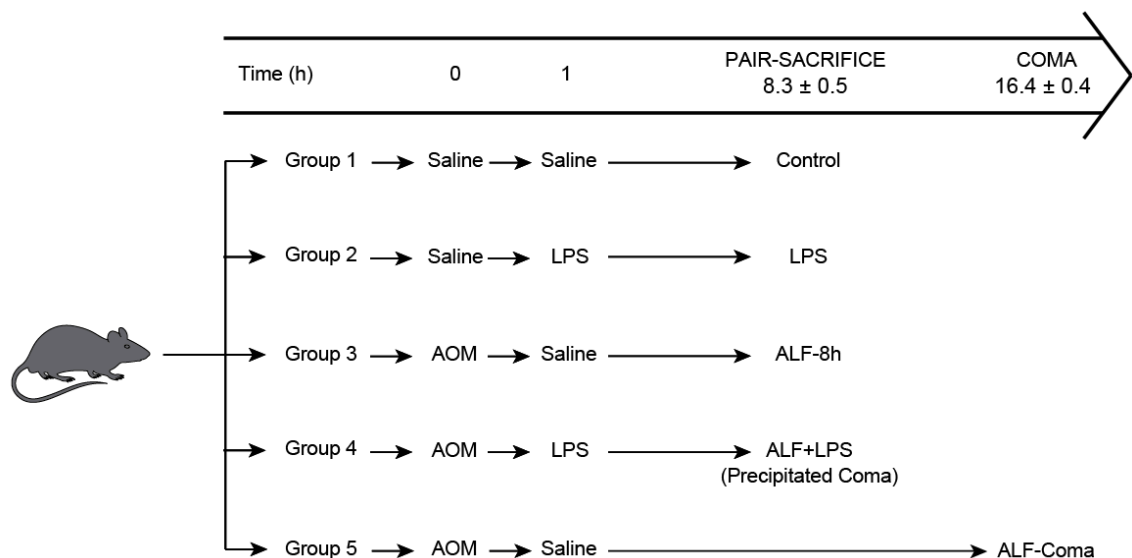


Figure 1. Experimental design. Schematic representation of the procedures and timeline followed for each group of the study. Mice from Control, LPS and ALF-8h groups were sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of hepatic encephalopathy on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. ALF-Coma mice were sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

Histological assessment of liver damage

Paraffin-embedded specimens were prepared and sections (6 μm) were mounted on Superfrost plus microscope slides (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). HPS (hematoxylin-phloxin-saffron) staining was performed according to a standard protocol and liver pathology was assessed by an investigator blinded to the experimental treatment groups.

Biochemical assays

Plasma samples were diluted 10-fold in saline and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were assayed with an automated analyzer. Ammonia levels in plasma were determined using a commercial ammonia assay kit (Sigma-Aldrich) Samples were diluted 40-fold in assay diluent and absorbance was read at 340 nm.

Plasma IL-6, IL-1 β and TNF- α measurements

Pro-inflammatory cytokine levels were measured in plasma using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits specific for mouse IL-6 (eBioscience, San Diego, CA, USA), IL- β and TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Detection limits were 4 pg/mL, 3 pg/mL and 5.1 pg/mL respectively. For plasma IL-1 β and TNF- α assays, samples were diluted 20-fold and 5-fold respectively in calibrator diluent and incubated 2 h at room temperature. For plasma IL-6 measurements, samples were diluted 17-fold in assay diluent and incubated overnight at 4°C. For IL-6 measurements in brain, cerebral cortex was homogenized in 50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.5), which contained a protease inhibitor

cocktail (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 12 000 g for 45 min. Cytosolic fractions were then diluted 5-fold in assay diluent and incubated overnight at 4°C. The plates were read at 450 nm and values at 570 nm were subtracted. Absorbance was converted to pg/ml using respective standard curves prepared with recombinant cytokines.

Western blot analysis

Samples of frontal cortex were homogenized in ice-cold buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% NaDOC) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 12 000 g for 45 min. Proteins (10-30 µg) were resolved on 8% denaturing SDS-polyacrylamide gels and transferred for 1 h to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Laboratories). The membranes were probed for 1 h with antibodies directed against ZO-1 (rabbit, 1/1000, #61-7300, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ZO-2 (rabbit, 1/1000, #38-9100, Invitrogen), occludin (rabbit, 1/1000, #71-1500, Invitrogen) and β-actin (mouse, 1/25 000, #A3853, Sigma-Aldrich), then incubated for 1 h with respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/10 000, Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). After extensive washing, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (GE, Arlington Heights, IL, USA). The intensity of the bands was measured by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

IgG extravasation

IgG extravasation was performed as previously described, with modifications (27). Briefly, 20 µg of protein from samples of frontal cortex were solubilized in Laemmli buffer, boiled for 5 min then resolved on 8% denaturing SDS-PAGE and transferred 1 h to

PVDF membranes. Membranes were incubated for 1 h with an anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1/3000, Perkin-Elmer Life Sciences). Peroxidase activity was then detected by enhanced chemiluminescence (Amersham). Intensity of the bands was measured by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

SDS-PAGE gelatin zymography

Gelatin zymography was performed as previously described, with modifications (27). Twenty μg of protein fraction were electrophoresed onto 10% non-denaturing SDS-PAGE containing 1 mg/mL of gelatin (Bio-Rad Laboratories). Mixtures (1.5 ng) of recombinant MMP-9 and MMP-2 (US Biological, Cleveland, OH, USA) were used as standards. The gels were processed, incubated in 2.5% Triton X-100 for 1 h, incubated in a zymogen buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, 0.02% Brij.35) at 37°C for 40 h, stained with 0.5% Coomassie Blue R-250 for 3 h, and destained with three changes of 30% methanol, 10% acetic acid (for 15, 30, and 60 min). Gels were scanned and the bands were quantified using Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories). Gelatinase activity appears as a clear band against a blue background.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc analysis. *p* value < 0.05 was considered to indicate a significant difference. Data were analyzed by using Prism 5.0 software (GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA).

Results

LPS precipitates HE in ALF mice

Following AOM administration, all mice developed HE progressing from lethargy and ataxia to loss of righting and corneal reflexes (coma stage). ALF-Coma mice became comatose 16.4 ± 0.4 h following AOM injection. LPS administration in ALF mice accelerated the progression of encephalopathy and onset of coma, occurring 8.3 ± 0.5 h after AOM injection in ALF+LPS mice ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

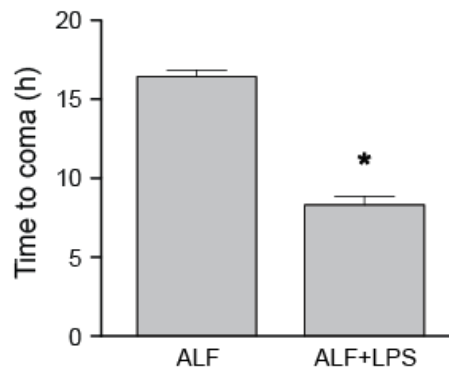


Figure 2. LPS precipitates the onset of coma stages of HE. Time to coma (loss of corneal reflexes) in ALF mice treated with LPS (ALF+LPS) or saline (ALF) 1 h after AOM injection. Data represent mean \pm SEM of $n = 6$ in each group.

LPS treatment worsens hepatic damage following AOM administration

AOM administration rapidly induced diffuse necrosis affecting primarily centrilobular and mediolobular regions in ALF-8h mice (Fig. 3C), which expanded at coma stages of HE to massive hemorrhagic necrosis and apoptosis with scarce neutrophil infiltration in ALF-Coma mice (Fig. 3D). In contrast, ALF+LPS mice displayed peliosis and increased neutrophil infiltration in addition to the massive hemorrhagic necrosis and

apoptosis found in ALF-Coma mice (Fig. 3E and 3F). LPS treatment alone induced hepatocyte ballooning (Fig. 3B). Both plasma transaminase activities and ammonia levels were significantly increased at the onset of coma in ALF+LPS mice. Compared to control mice, AST activity was increased 9.2-fold ($p < 0.001$) in ALF+LPS mice, whereas ALT activity was increased 29.5-fold ($p < 0.001$) (Table 1). Plasma ammonia levels were increased 2.8-fold ($p < 0.001$) in ALF+LPS mice compared to control mice (Table 1). No changes were observed in transaminase activities or in ammonia levels in LPS mice or in ALF-8h mice. Compared to control mice, AST and ALT activities were respectively increased 13.2-fold (4086 ± 484 ; $p < 0.001$) and 42.2-fold (4057 ± 2176 ; $p < 0.001$) in ALF-8h mice, whereas plasma levels of ammonia were increased 4.1-fold (535.1 ± 63.0 ; $p < 0.001$). Plasma levels of AST, ALT and ammonia in ALF-Coma mice were not significantly different to those from ALF+LPS mice.

	Control	LPS	ALF-8h	ALF+LPS
AST (U/L)	310 ± 46	860 ± 180	1193 ± 299	$2843 \pm 422^*$
ALT (U/L)	96 ± 23	215 ± 87	535 ± 351	$2842 \pm 511^*$
Ammonia (μM)	131.8 ± 26.3	118.0 ± 11.3	144.9 ± 24.7	$370.2 \pm 53.0^*$

Table 1. LPS increases plasma transaminases activities and ammonia levels in ALF mice. Data represent mean \pm SEM of $n = 10$ in each group. * $p < 0.01$ vs. all groups. Mice from Control, LPS and ALF-8h groups were sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. ALF-Coma mice were sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

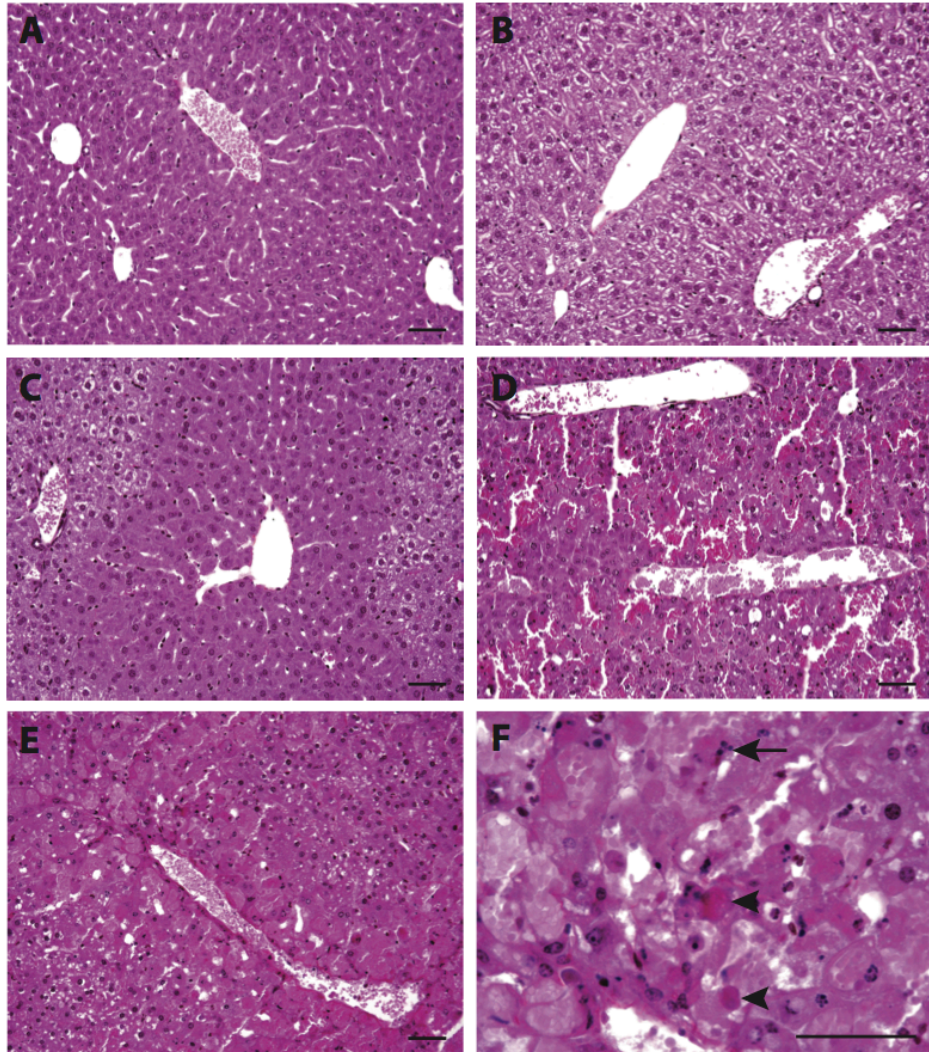


Figure 3. LPS worsens the hepatic pathology in ALF mice. Representative liver sections from (A) Control mice, (B) LPS mice, (C) ALF-8h mice, (D) ALF-Coma mice, and (E and F) ALF+LPS mice. Mice from Control, LPS and ALF-8h groups were sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE, on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. ALF-Coma mice were sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection. ALF-8h mice show early centrilobular necrosis (C) that progress into extensive hemorrhagic liver necrosis at coma stages in ALF-Coma mice (D). LPS challenge during ALF results in extensive coagulative liver necrosis with peliosis and increased neutrophil infiltration in comatose ALF+LPS mice (E and F). Black arrow shows neutrophil infiltration. Arrow heads indicate areas of apoptosis. Representative pictures from $n = 5$ in each group. Scale bar : 50 μm .

LPS treatment results in further increases in plasma pro-inflammatory cytokines in ALF mice

Compared to control mice, significant increases in TNF- α levels were observed in ALF-8h mice (3.6-fold; $p < 0.05$), in ALF+LPS mice (7.1-fold; $p < 0.001$) and in ALF-Coma mice (3.7-fold; $p < 0.05$) (Fig. 4A). Interestingly, TNF- α levels in ALF+LPS mice were 2-fold higher than those observed in ALF-8h mice and in ALF-Coma mice ($p < 0.01$) (Fig. 4A). Similarly, IL-6 levels were significantly increased in ALF-8h mice (153.5-fold; $p < 0.05$), in ALF+LPS mice (332.0-fold; $p < 0.001$) and in ALF-Coma mice (149.6-fold; $p < 0.05$) compared to control mice (Fig. 4B). IL-6 levels were significantly higher in ALF+LPS compared to ALF-8h mice (2.2-fold; $p < 0.01$) and to ALF-Coma mice (2.2-fold; $p < 0.01$) (Fig. 4B). IL-1 β levels were significantly increased in ALF+LPS mice compared to control mice (48.9-fold; $p < 0.001$) (Fig. 4C). LPS alone did not significantly increase plasma levels of TNF- α , IL-1 β or IL-6.

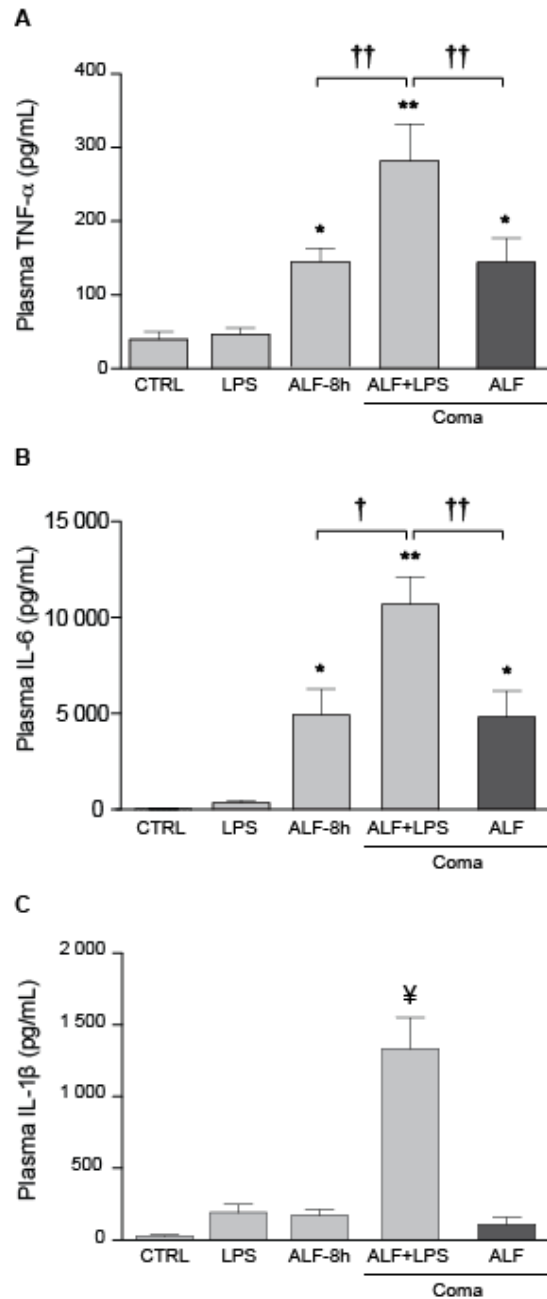


Figure 4. Circulating pro-inflammatory cytokines are further increased at coma stages of HE in LPS-treated ALF mice. Plasma TNF- α (A), IL-6 (B) and IL-1 β (C) were quantified by ELISA. Data represent mean \pm SEM of $n = 8$ in each group. * $p < 0.05$ vs. Control; ** $p < 0.001$ vs. Control; \yen $p < 0.001$ vs. all other groups; \dagger $p < 0.05$; $\dagger\dagger$ $p < 0.01$. : Mice from Control, LPS and ALF-8h groups are sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. : ALF-Coma mice are sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

LPS treatment results in a further increase of MMP-9 activity in AOM-induced ALF mice

No changes of protein expression were observed for ZO-1, ZO-2 or occludin in either group (data not shown). Gelatin zymography analysis showed increased activity of brain MMP-9 in ALF-8h mice (5.7-fold; $p < 0.05$), in ALF+LPS mice (11.3-fold; $p < 0.001$), and in ALF-Coma mice (6.9-fold; $p < 0.01$) compared to control mice (Fig. 5). MMP-9 activity in brain of ALF+LPS mice was significantly higher than that in the brains of ALF-8h mice (2-fold; $p < 0.01$) and of ALF-Coma mice (1.7-fold; $p < 0.05$). LPS treatment alone had no effect on brain MMP-9 activity. No changes in MMP-2 activity were demonstrated in any of the treatment groups (Fig. 5).

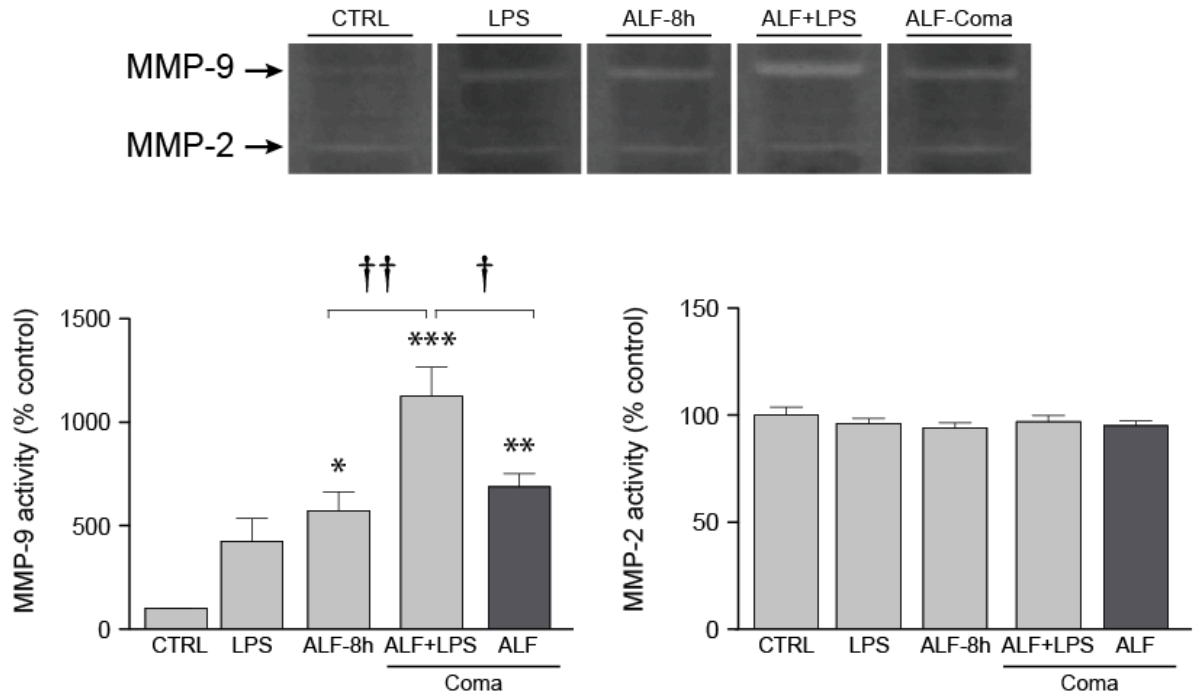


Figure 5. ALF mice challenged with LPS display a further increase of MMP-9 activity compared to ALF mice. Activity of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) and 2 (MMP-2) was quantified by zymography and expressed as a percentage of control. Data represent mean \pm SEM of $n = 8$ in each group. * $p < 0.05$ vs. Control; ** $p < 0.01$ vs. Control; *** $p < 0.001$ vs. Control; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$. : Mice from Control, LPS and ALF-8h groups are sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. : ALF-Coma mice are sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

LPS treatment results in IgG extravasation in brain of AOM-induced ALF mice

A significant increase in brain IgG extravasation was observed in ALF+LPS mice compared to control mice (16.0-fold; $p < 0.01$) (Fig. 6). No significant IgG extravasation was observed in LPS mice or in ALF-8h mice or in ALF-Coma mice.

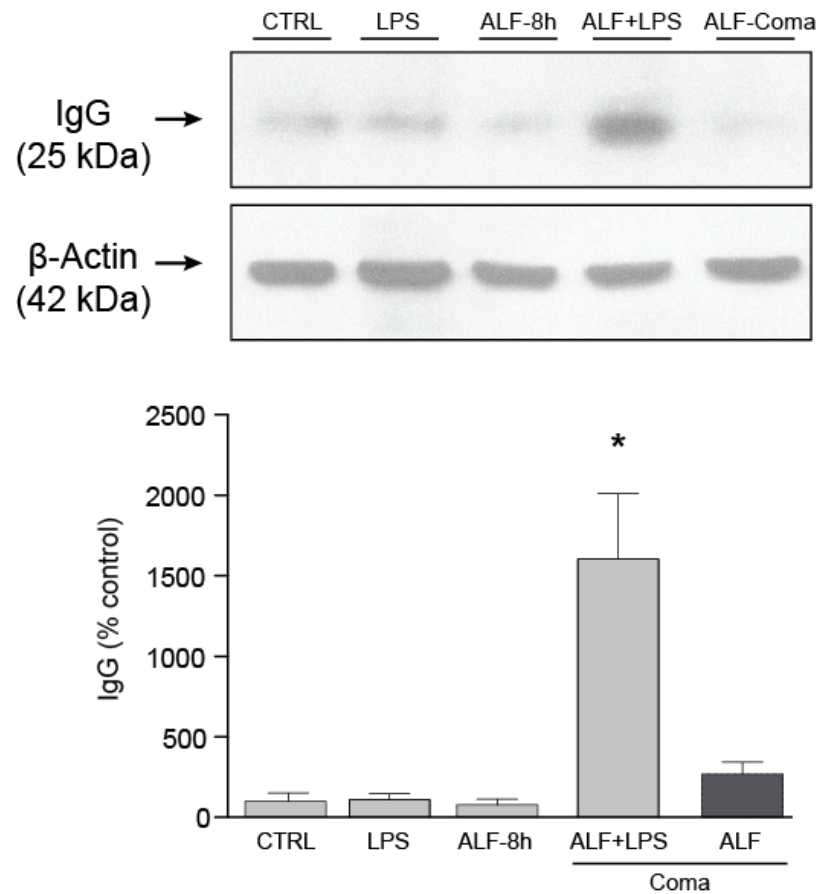


Figure 6. LPS challenge results in IgG extravasation in brain of ALF mice at coma stages of encephalopathy. IgG extravasation (light chain) was quantified by western blot analysis, normalized versus β -actin and expressed as a percentage of control. Data represent mean \pm SEM of $n = 10$ in each group. * $p < 0.01$ vs. all groups. : Mice from Control, LPS and ALF-8h groups are sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. : ALF-Coma mice are sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

LPS treatment results in a further increase in IL-6 levels in brain of AOM-induced ALF mice

Compared to control mice, ALF led to a significant increase of brain IL-6 levels in ALF+LPS mice (2.2-fold; $p < 0.001$) and in ALF-Coma mice (1.7-fold; $p < 0.01$) (Fig 7). Cerebral IL-6 levels in ALF+LPS mice were significantly higher than those in ALF-8h mice (1.4-fold; $p < 0.05$) and in ALF-Coma mice (1.3-fold; $p < 0.05$). LPS treatment alone had no effect on brain IL-6 levels (Fig. 6).

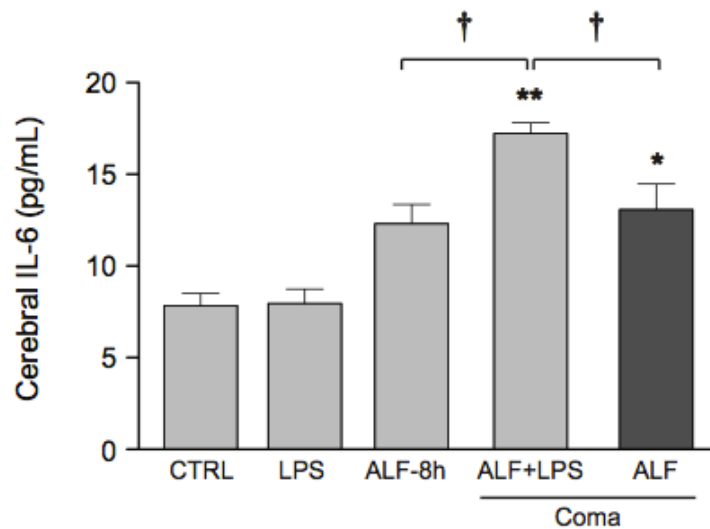


Figure 7. LPS challenge in ALF mice results in a further increase of cerebral IL-6 levels compared to ALF mice. Cerebral IL-6 levels were quantified by ELISA. Data represent mean \pm SEM of $n = 5$ in each group. * $p < 0.01$ vs. Control; ** $p < 0.001$ vs. Control; † $p < 0.05$. : Mice from Control, LPS and ALF-8h groups are sacrificed along with ALF+LPS mice, when ALF+LPS mice reached coma stages of HE on average 8.3 ± 0.5 h following AOM injection. : ALF-Coma mice are sacrificed at coma stages of HE, which occurs 16.4 ± 0.4 h following AOM injection.

Discussion

The activation of systemic immune responses, including SIRS, plays a pivotal role in the pathogenesis and outcome of ALF. SIRS is the clinical manifestation of an uncontrolled generalized inflammatory response that may have either a noninfectious or an infectious cause, the latter being referred to as sepsis (28). Large clinical studies have demonstrated that SIRS is associated with an increasing grade of HE and a poor outcome in ALF patients (11, 12). Moreover, between 50% and 90% of ALF patients develop infections, which may increase the risk of developing a SIRS and subsequent worsening of HE (11, 14). Importantly, both Gram-negative and Gram-positive bacteria may result in a similar degree of SIRS (11). LPS endotoxin, which is the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, was therefore used in the present study to induce endotoxemia in the well-characterized AOM-induced ALF model in mice. The dose of LPS selected in the present study was at least 500-fold lower than that used in murine models of sepsis (26), and no death or obvious signs of sepsis were observed following administration of LPS alone. However, in ALF mice, LPS accelerated the appearance of hepatic damage and precipitated the progression of HE and onset of coma stages. Indeed, coma stages of HE appeared significantly earlier in ALF+LPS mice (8.3 ± 0.5 h following AOM administration), and were accompanied by hepatic hemorrhagic necrosis and apoptosis, as well as elevations in plasma levels of ammonia and transaminases comparable to those observed at coma stages of HE in ALF-Coma mice (16.4 ± 0.4 h following AOM administration). In addition, unlike ALF-Coma mice, ALF+LPS mice displayed peliosis as a result of severe liver necrosis, as well as increased neutrophil infiltration, which is characteristic of a superinfection, attributable to LPS. LPS treatment alone induced

hepatocyte ballooning with no signs of necrosis or increases of ammonia or transaminase levels. Taken together, these results suggest that endotoxemia in ALF mice, worsens hepatic pathology and the recruitment of immune cells that may, in turn, lead to further hepatocellular damage.

The immune response associated with ALF (29) and SIRS (30) is accompanied by the secretion of large amounts of pro-inflammatory cytokines by innate immune cells such as macrophages and monocytes. Levels of circulating pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β are increased both in patients with ALF (4, 10) and in animal models (6, 31, 32). Furthermore, TNF- α levels are strongly correlated with the severity of ALF and poor prognosis (8, 9). Results of the present study demonstrate that plasma TNF- α and IL-6 levels were elevated 8 h after AOM administration and remained elevated at coma stages of HE. These observations confirm those of a previous study which demonstrated that TNF- α and IL-6 levels were increased early following AOM-induced ALF but do not correlate with the onset of coma stages (32). This suggests that these inflammatory mediators may play a role in concert with other factors such as ammonia, the concentration of which reached statistical significance only at coma stages of HE. LPS challenge during ALF resulted in a further increase of these cytokines, whereas LPS alone had no effect on the levels of these cytokines, demonstrating on the one hand, that the dose of LPS is below the threshold that induces secretion of detectable levels of these pro-inflammatory cytokines, and suggesting on the other, a synergism between ALF-induced and LPS-induced inflammatory mechanisms. Interestingly, plasma levels of IL-1 β were only increased at coma stages of HE in ALF+LPS mice, suggesting that this cytokine may selectively play a role in this synergistic effect.

The CNS complications of ALF have been shown to involve neuroinflammatory mechanisms (33). Previous studies have indeed demonstrated microglial activation and cerebral production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 in ALF patients (5) and in animal models of ALF (6, 32). Results of the present study confirm and extend these findings by demonstrating that accumulation of IL-6 in brain at coma stages of HE in ALF mice was further increased by systemic administration of LPS. LPS alone had no effect on the cerebral production of IL-6, again suggesting a synergistic effect between ALF-induced and LPS-induced inflammatory mechanisms. Interestingly, cerebral IL-6 levels were correlated with circulating levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, pointing to a close relationship between systemic and central inflammation in the context of ALF.

Potential disturbances in BBB permeability during ALF have long been a matter of debate. Recent studies have demonstrated a loss in expression of ZO-2, which was correlated with increased permeability of the BBB to fluorescein in AOM-induced ALF (34), while a selective loss of occludin has been reported in both ALF patients and mice with galactosamine-induced ALF (22). Moreover, a role of MMPs in the pathophysiological mechanisms leading to increased BBB permeability during ALF has recently been proposed (20). MMP-2 and MMP-9 are zinc-dependent endopeptidases that are secreted by various cell types such as monocytes and macrophages, as well as by most neural cell types including neurons, endothelial cells, and reactive astrocytes and microglia (35). MMP-2 and MMP-9 act extracellularly by digesting components of the basal lamina around capillaries (36), and have been shown to increase BBB permeability as a part of the neuroinflammatory mechanisms involved in multiple sclerosis and bacterial meningitis

(37). In mice with AOM-induced ALF, it has been reported that circulating levels of MMP-9 were increased as a result of its release by the necrotic liver, and that this was correlated with increases in BBB permeability and brain edema (20), possibly as a result of degradation of the TJ proteins occludin and claudin-5 by MMP-9 (21). Increases in plasma MMP-9 were later confirmed in patients with ALF; however, there was no correlation between MMP-9 levels and intracranial hypertension (19). The causal relationship between increased circulating MMP-9 and alterations in BBB permeability thus remains controversial, especially given that MMPs are large molecules that are unlikely to cross the BBB in order to exert their protease activity inside the brain (19, 20). Moreover, the vast majority of data available indicates that the BBB remains grossly intact in ALF (16, 17). However, this does not exclude the possibility that MMPs released within the brain may contribute to changes in BBB permeability in certain conditions. Because certain MMPs such as MMP-9 are activated by pro-inflammatory stimuli (24), we investigated the potential role of MMPs in the precipitating effects of LPS in ALF mice. Results of the present study demonstrate that activity of cerebral MMP-9 is increased early in ALF-8h mice and is maintained in ALF-Coma mice, suggesting that neuroinflammation that occurs in ALF may indeed lead to activation of cerebral MMP-9. Activity of cerebral MMP-9 was further increased in ALF+LPS mice, and was accompanied by an accumulation of IgG in the brains of these mice, consistent with a major increase of the BBB permeability and pointing to synergistic neuroinflammatory mechanisms. In contrast, no significant accumulation of IgG was observed in the brains of ALF-8h mice or ALF-Coma mice, consistent with the notion that the BBB remains intact in ALF. Furthermore, no changes in constitutive proteins of the BBB were demonstrated in either group, confirming, on the one hand, previous neurological studies (16, 17) and suggesting, on the other, that BBB

disruption in ALF+LPS did not involve TJ digestion. Other mechanisms, such as the degradation of the basal lamina by MMP-9, might participate in the increase in BBB permeability observed in ALF+LPS mice. Interestingly, cerebral MMP-9 activity was specifically induced, the expression and activation of which, unlike MMP-2, is known to be modulated by inflammatory stimuli such as TNF- α and IL-1 β (38, 39) which are also involved in the CNS complications of ALF (5-7, 40).

Taken together, these results suggest that the onset of coma stages of HE involves different pathophysiological mechanisms depending if ALF is complicated or not by endotoxemia. In non-endotoxemic ALF, onset of coma stages was not associated with overt BBB breakdown, consistent with previous studies both in ALF patients (16, 41) and in experimental ALF (17, 18, 42). Moreover, despite conflicting reports on TJ expression in experimental ALF (21, 22, 34), our results showing unchanged TJ proteins and the absence of IgG extravasation in AOM-induced ALF in the absence of LPS treatment are consistent with our previous findings (17). The reason for the abovementioned inconsistencies remain to be elucidated but differences in technical approaches and disparities in animal models may be involved, as discussed in detail elsewhere (17). In contrast, our findings in endotoxemic ALF demonstrate systemic and cerebral inflammatory mechanisms that were synergistically increased upon LPS treatment and associated with a worsening of liver disease. Moreover, an important increase in cerebral MMP-9 activity, which was accompanied by extravasation of the endogen IgG, indicates a large increase of the BBB permeability specifically in this group.

In conclusion, findings of the present study confirm the clinical observation that infection during ALF leads to the worsening of HE (11, 14) and provide, for the first time,

direct evidence that endotoxemia leads to a major increase of the BBB permeability in the context of ALF. Therefore, prompt and effective treatment of infection may have the potential to prevent the increase of BBB permeability and, thus, avert or delay the serious CNS consequences of ALF.

References

1. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970;3:282-298.
2. Blei AT, Larsen FS. Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 1999;31:771-776.
3. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002;17:221-227.
4. Sekiyama KD, Yoshihara M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1994;98:71-77.
5. Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* 2007;22:375-388.
6. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:944-952.
7. Bemeur C, Qu H, Desjardins P, Butterworth RF. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 2010;56:213-215.
8. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, et al. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 2000;119:446-460.

9. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000;182:1103-1108.
10. Odeh M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur J Clin Invest* 2007;37:291-304.
11. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 2000;32:734-739.
12. Schmidt LE, Larsen FS. Prognostic implications of hyperlactatemia, multiple organ failure, and systemic inflammatory response syndrome in patients with acetaminophen-induced acute liver failure. *Crit Care Med* 2006;34:337-343.
13. Rolando N, Gimson A, Wade J, Philpott-Howard J, Casewell M, Williams R. Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure. *Hepatology* 1993;17:196-201.
14. Vaquero J, Polson J, Chung C, Helenowski I, Schiodt FV, Reisch J, Lee WM, et al. Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology* 2003;125:755-764.
15. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005;57:173-185.
16. Kato M, Hughes RD, Keays RT, Williams R. Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure. *Hepatology* 1992;15:1060-1066.

17. Bémour C, Chastre A, Desjardins P, Butterworth RF. No changes in expression of tight junction proteins or blood-brain barrier permeability in azoxymethane experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 2010;56:205-207.
18. Nguyen JH. Subtle BBB alterations in brain edema associated with acute liver failure. *Neurochem Int* 2010;56:203-204; author reply 205-207.
19. Palenzuela L, Mas A, Montaner J, Cordoba J. Matrix metalloproteinase-9 in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 2010;51:1475-1476; author reply 1476.
20. Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J Hepatol* 2006;44:1105-1114.
21. Chen F, Ohashi N, Li W, Eckman C, Nguyen JH. Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure. *Hepatology* 2009;50:1914-1923.
22. Lv S, Song HL, Zhou Y, Li LX, Cui W, Wang W, Liu P. Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. *Liver Int* 2010;30:1198-1210.
23. Cauli O, Lopez-Larrubia P, Rodrigo R, Agusti A, Boix J, Nieto-Charques L, Cerdan S, et al. Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats. *Gastroenterology* 2011;140:638-645.
24. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 1998;274:R1203-1211.

25. Belanger M, Cote J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem Int* 2006;48:434-440.
26. Warren HS. Editorial: Mouse models to study sepsis syndrome in humans. *J Leukoc Biol* 2009;86:199-201.
27. Beauchesne E, Desjardins P, Butterworth RF, Hazell AS. Up-regulation of caveolin-1 and blood-brain barrier breakdown are attenuated by N-acetylcysteine in thiamine deficiency. *Neurochem Int* 2010;57:830-837.
28. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000;26 Suppl 1:S64-74.
29. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 2010;30:782-794.
30. Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 2009;69:479-491.
31. Bemeur C, Vaquero J, Desjardins P, Butterworth RF. N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Metab Brain Dis* 2010;25:241-249.
32. Chastre A, Belanger M, Beauchesne E, Nguyen BN, Desjardins P, Butterworth RF. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLoS One* 2012;7:e49670.

33. Butterworth RF. Neuroinflammation in acute liver failure: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Neurochem Int* 2011;59:830-836.
34. Shimojima N, Eckman CB, McKinney M, Sevlever D, Yamamoto S, Lin W, Dickson DW, et al. Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure. *J Invest Surg* 2008;21:101-108.
35. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009;158:983-994.
36. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007;42:113-185.
37. Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36:249-257.
38. Sharief MK, Thompson EJ. In vivo relationship of tumor necrosis factor-alpha to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992;38:27-33.
39. Quagliarello V, Scheld WM. Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* 1992;327:864-872.
40. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J Neurochem* 2009;109:485-493.

41. Ranjan P, Mishra AM, Kale R, Saraswat VA, Gupta RK. Cytotoxic edema is responsible for raised intracranial pressure in fulminant hepatic failure: in vivo demonstration using diffusion-weighted MRI in human subjects. *Metab Brain Dis* 2005;20:181-192.

42. Chavarria L, Oria M, Romero-Gimenez J, Alonso J, Lope-Piedrafita S, Cordoba J. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* 2010;138:1566-1573.

Troisième article :

No changes in expression of tight junction proteins or blood-brain barrier permeability in azoxymethane-induced experimental acute liver failure

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article

Anne Chastre a participé à la réalisation des plans expérimentaux et exécuté l'étude d'expression des jonctions serrées ainsi que l'analyse respective des données. Anne Chastre a participé à la rédaction du manuscrit. Le Dr. Bémour a réalisé la majeure partie de la rédaction de l'article et les Drs. Desjardins et Butterworth ont participé à la correction du manuscrit.

Neurochemistry International 56(2):205-207, 2010

**No changes in expression of tight junction proteins or
blood-brain barrier permeability in azoxymethane-
induced experimental acute liver failure**

Chantal Bémour, Anne Chastre, Paul Desjardins and Roger F. Butterworth*

Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital, CRCHUM, Montreal, Canada

*Corresponding Author:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Neuroscience Research Unit
CHUM, Campus Saint-Luc

Université de Montréal

1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec, Canada
H2X 3J4

Phone: (514) 890-8000 Ext. 35759

Fax: (514) 412-7253

Dear Sirs,

Advances in molecular and imaging techniques have ushered in an era of renewed interest in blood-brain barrier (BBB) permeability in a wide range of clinical disorders. Using these techniques, two studies recently assessed BBB structure and permeability in well-characterized models of acute liver failure (ALF) resulting from either hepatic devascularization in the rat (Sawara et al., 2009) or azoxymethane-induced toxic liver injury in the mouse (Shimojima et al., 2008). In the latter study, expression of the tight junction (TJ) proteins occludin, zona occludens ZO-1 and ZO-2 and claudin-5 were studied. A selective loss of ZO-2 was found to precede the onset of encephalopathy (coma) and increased permeability of the BBB to fluorescein. Relationship of the loss of ZO-2 expression to the presence of brain edema was unclear since brain water measurements were not made in this study. ZO-2 is a TJ scaffolding protein that is intimately involved in BBB integrity, serving as part of the support structure for signal transduction proteins at the BBB, and the primary cytoskeletal protein, actin, has binding sites for all the ZO family of proteins including ZO-2 (Huber et al., 2001). This finding of a loss of a key structural protein, coupled with the observation of extravasation of fluorescein in the ALF animals in the Shimojima et al. (2008) study led the authors to conclude that their findings represented the first direct evidence of vasogenic brain edema in experimental ALF (Nguyen, 2009). Subsequently, Sawara et al. (2009) interpreted these findings as “physical breakdown of the BBB”. Whether or not loss of a structural protein (ZO-2) and extravasation of fluorescein constitutes a physical breakdown of the barrier remains a matter of debate (Nguyen et al., 2006) and, to some extent, semantics. Shimojima et al. (2008) did not measure permeability of the BBB to larger molecules, so the issue of structural breakdown (or not) was not assessed at that time.

In order to further address this issue, a series of studies were undertaken in the azoxymethane mouse model of ALF to measure expression of occludin, ZO-1 and ZO-2 in relation to the presence of brain edema and BBB permeability. Fifteen-week-old male (30-40g) wild-type C57BL/6J mice received a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) (100 µg/g; Sigma-Aldrich, St-Louis, CO) dissolved in 100 µl saline as previously described (Bélanger et al., 2006a). Control animals received an equivalent volume of saline. Following administration of AOM, body temperature was rigorously maintained at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ by means of heating pads and lamps. Blood glucose concentrations were maintained by means of subcutaneous injection of a sterile 10% dextrose solution. All animals were free of infection at the onset of the experiments. When coma/edema stages of encephalopathy were reached, animals were sacrificed and brains were rapidly removed, flash frozen in isopentane and stored at -70°C . Brain water content was measured gravimetrically as previously described (Bélanger et al., 2006a). BBB permeability was measured by immunoglobulin G (IgG) extravasation and expression of occludin, ZO-1 and ZO-2 was measured by Western blot analysis as previously described (Beauchesne et al., 2009).

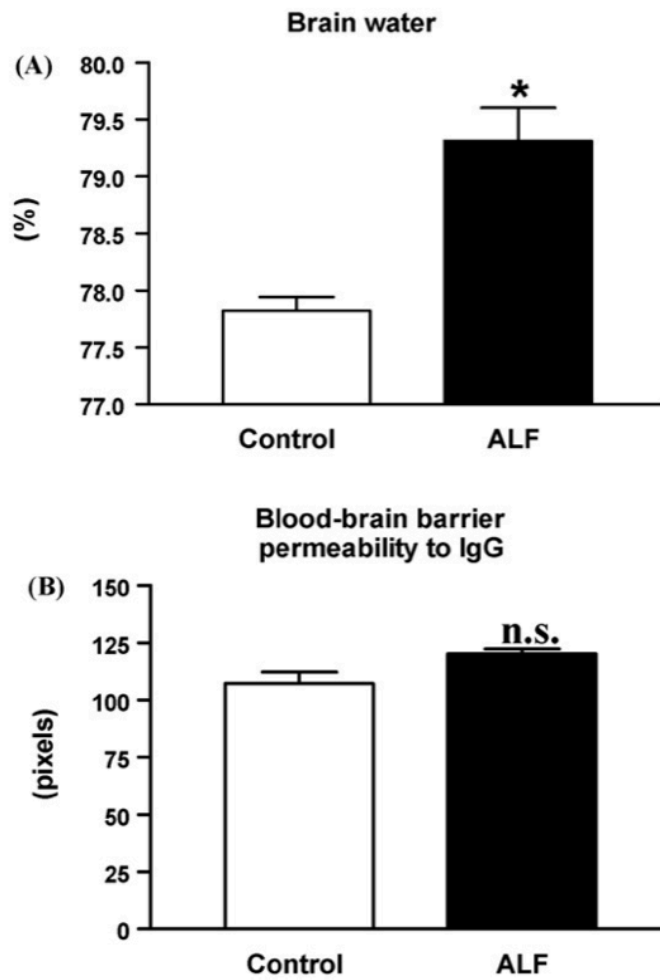


Figure 1. A) Water content of cerebral cortex in AOM-treated mice (ALF) or vehicle-treated controls; (* $p < 0.01$ vs. Control by Student's t -test). B) Lack of IgG extravasation in AOM-treated mice (ALF) and saline-treated controls. Data represent mean \pm S.E.M. of $n = 5$ animals per treatment group. n.s: not significantly different from control values.

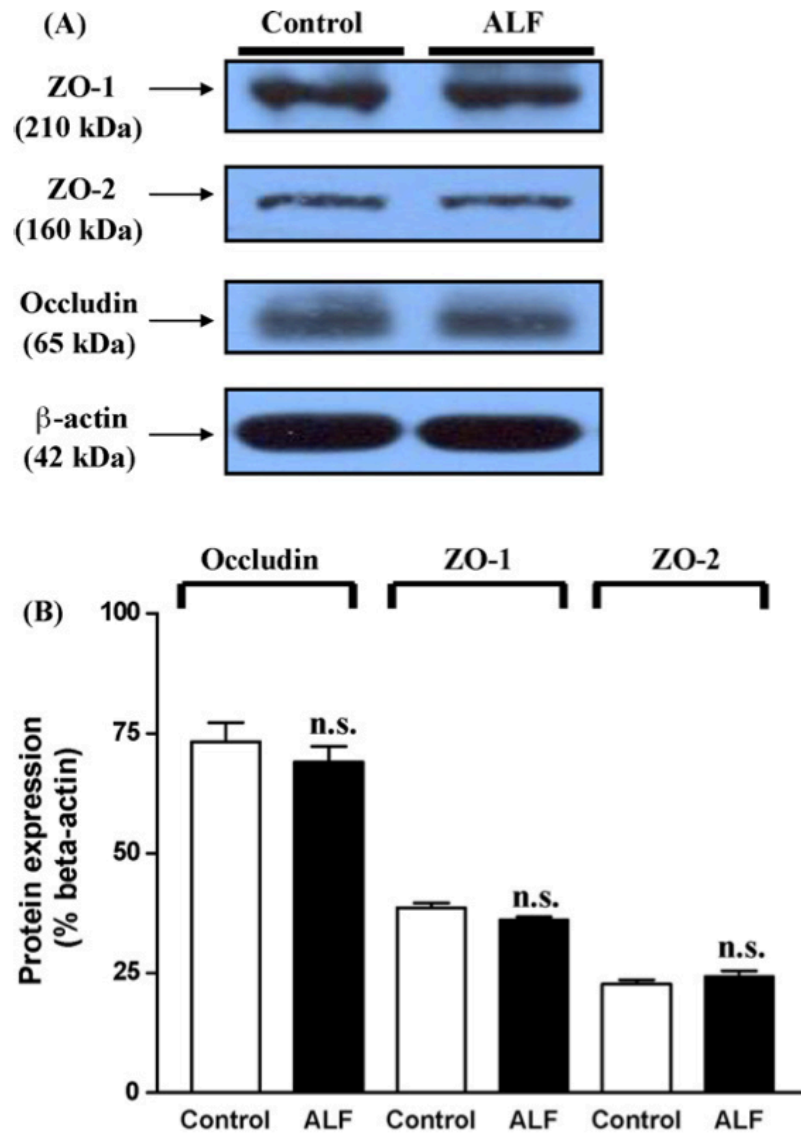


Figure 2. A) Representative western blots of ZO-1, ZO-2 and occludin in the frontal cortex of AOM-treated mice (ALF) compared to vehicle-treated controls. B) Quantification of the data shown in panel A. Data were normalized to β -actin expression and represent mean \pm S.E.M. of $n = 5$ animals per treatment group. n.s: not significantly different from control values.

As can be clearly seen from Figures 1 and 2, edematous stages of encephalopathy (coma) in mice with azoxymethane-induced liver injury were not associated with alterations in expression of the TJ proteins occludin ZO-1 or ZO-2 or with altered permeability in the BBB to IgG, consistent with no structural breakdown of the BBB. These findings confirm and extend those of other studies in ALF animals with toxic liver injury resulting from galactosamine (Traber et al., 1987) and in our study in rats with ischemic liver failure (Sawara et al., 2009). Their findings of extravasation of fluorescein under the experimental ALF conditions reported by Shimojima et al. (2008) led the authors to conclude that the BBB permeability to water would be increased (Nguyen, 2009). However, no direct measurements were made to assess this issue. It should be noted that the passage of water is mediated by water channels such as aquaporin IV and the glucose transporter (GLUT-1) and that increases in expression of these proteins has been reported in ALF (Rama Rao et al., 2003; Bélanger et al., 2006b). Moreover, in an elegant recent study by Chavarria et al. (2009) using the technique of Diffusion Tensor Imaging to assess the intra or extracellular distribution of brain water in the devascularized rat model of ALF, BBB permeability assessed from the transfer constant of ¹⁴C-labelled sucrose was found to be unaltered and concomitant decreases of the apparent diffusion coefficient in these animals led the investigators to conclude that edema was primarily cytotoxic in nature in these animals.

The reason for the lack of agreement on effects of azoxymethane-induced ALF on TJ integrity and BBB permeability between the present study and that of Shimojima et al. (2008) could result from differences in body temperature of the animals. A careful inspection of the experimental details in the study of Shimojima et al. (2008) reveals that, while attempts were made to control body temperature in their animals, those attempts were

unsuccessful and the animals became moderately hypothermic (34.2°C). Consequently, the time to coma was significantly longer (26.3 h compared to previously published times of 12-16 h) (Bélangier et al., 2006a). Using the 37°C temperature-maintained paradigm, azoxymethane-treated mice manifest extensive microvesicular steatosis with foci of necrosis but azoxymethane-treated mice allowed to become hypothermic (35°C) have more moderate liver damage upon pathologic evaluation and significantly lower levels of blood transaminases (Bélangier et al., 2006a). Inadequate control of body temperature has been brought to the attention of the research community working on ALF mechanisms by Vaquero et al. (2006) who concluded that variations of body temperature could explain the low reproducibility and discordant results frequently reported in ALF models. The authors went on to suggest that given the multitude of temperature-sensitive hepatic and cerebral processes, studies of ALF models in which body temperature was not rigorously controlled should be interpreted with caution. Differences in body temperature offer a cogent explanation for the discordance between the findings of Shimojima et al. (2008) and those of the present study.

Findings of an effect of hypothermia on changes of hepatic and cerebral function are features not only of azoxymethane-induced ALF, but extend to ALF of other etiologies. For example, hypothermia is hepatoprotective in animal models of acetaminophen-induced ALF (Vaquero et al., 2007) and hypothermia prevents intracranial hypertension in patients with ALF primarily caused by acetaminophen overdose (Jalan et al., 1999). In the report by Sawara et al. (2009) significant decreases of occludin gene expression in the brains of rats with ALF due to hepatic devascularization were reported. However, mild hypothermia (35°C) sufficient to prevent encephalopathy and brain edema in these animals had no effect

on decreased brain occludin expression, suggesting that these changes of TJ expression were not implicated in the pathogenesis of brain edema in this model of ALF.

In summary, a review of the literature together with the findings of the studies of Shimojima et al. (2008) and current correspondance leads us to conclude that:

- (1) There is little (if any) evidence to suggest that the BBB becomes permeable to large molecules in ALF. Whether or not the BBB is permeable to small molecules such as ammonia or water in ALF and, if so, whether such changes result from changes in transport via appropriate channels or from increased extravasation remains to be established.
- (2) Maintenance of body temperature is essential for the study of basic pathophysiologic mechanisms responsible for hepatic damage or neurological consequences of ALF.
- (3) Although discrete changes in expression of genes coding for proteins involved in the neurovascular unit (including TJ proteins) have been reported, the role of these changes in the pathogenesis of brain edema in ALF is unclear.
- (4) Based upon studies in both ALF patients and experimental animal models of ALF of multiple etiologies, brain edema in ALF is predominantly cytotoxic in nature.

Chantal Bémour
Anne Chastre
Paul Desjardins
Roger F. Butterworth

Neuroscience Research Unit, Hôpital Saint-Luc (CHUM)
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

References

- Beauchesne, E., Desjardins, P., Hazell, A.S., Butterworth, R.F., 2009. Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem. Int.* 55, 275-281.
- Bélanger, M., Côté, J., Butterworth, R.F., 2006. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem. Int.* 48, 434-440.
- Chavarria, L., Oria, M., Romero, J., Alonso, J., Lope-Piedrafita, S., Cordoba, J., 2009. Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure. *Gastroenterology* (in press).
- Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P., 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 24, 719-725.
- Jalan, R., Damink, S.W., Deutz, N.E., Lee, A., Hayes, P.C., 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* 354, 1164-1168.
- Nguyen, J.H., Yamamoto, S., Steers, J., Sevlever, D., Lin, W., Shimojima, N., Castanedes-Casey, M., Genco, P., Golde, T., Richelson, E., Dickson, D., McKinney, M., Eckman, C.B., 2006. Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *J. Hepatol.* 44, 1105-1114.
- Nguyen, J.H. 2009. Subtle BBB alterations in brain edema associated with acute liver failure. *Neurochem. Int.* (in press).
- Traber, P.G., Dal Canto, M., Ganger, D.R., Blei, A.T., 1987. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology* 7, 1272-1277.

Sawara, K., Desjardins, P., Chatauret, N., Kato, A., Suzuki, K., Butterworth, R.F., 2009. Alterations in expression of genes coding for proteins of the neurovascular unit in ischemic liver failure. *Neurochem. Int.* 55, 119-123.

Shimajima, N., Eckman, C.B., McKinney, M., Sevlever, D., Yamamoto, S., Lin, W., Dickson, D.W., Nguyen, J.H., 2008. Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure. *J. Invest. Surg.* 21, 101-108.

Vaquero, J., Bélanger, M., Blei, A.T., Butterworth, R.F., 2006. Lack of assessment of body temperature in mice with acetaminophen toxicity. *Hepatology* 44, 279-280.

Vaquero, J., Bélanger, M., James, L., Herrero, R., Desjardins, P., Cote, J., Blei, A.T., Butterworth, R.F., 2007. Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survival in mice with acetaminophen toxicity. *Gastroenterology* 132, 372-383.

Quatrième article :

**Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression
of genes coding for astrocytic proteins implicated
in brain edema in acute liver failure**

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans cet article

Anne Chastre a réalisé les plans expérimentaux et exécuté la majorité des expériences ainsi que l'analyse des données. Le Dr. Jiang a participé aux expériences d'expression génique. Anne Chastre a rédigé la totalité du manuscrit. Les Drs. Desjardins et Butterworth ont participé à la correction du manuscrit.

Metabolic Brain Disease 2010 Mar;25(1):17-21

**Ammonia and proinflammatory cytokines modify
expression of genes coding for astrocytic proteins
implicated in brain edema in acute liver failure**

Anne Chastre, Wenlei Jiang, Paul Desjardins and Roger F. Butterworth*

¹Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital, CRCHUM, Montreal, Canada

*Corresponding Author:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Neuroscience Research Unit
CHUM, Campus Saint-Luc

Université de Montréal

1058 St-Denis Street
Montreal, Quebec, Canada
H2X 3J4

Phone: (514) 890-8000 Ext. 35759

Fax: (514) 412-7253

Abstract

There is evidence to suggest that, in acute liver failure (ALF), brain ammonia and proinflammatory cytokines may act synergistically to cause brain edema and its complications (intracranial hypertension, brain herniation). However, the molecular mechanisms involved remain to be established. In order to start to address this issue, semi-quantitative RT-PCR was used to measure the expression of genes coding for astrocytic proteins with an established role in cell volume regulation in cerebral cortical astrocytes exposed to toxic agents previously identified in experimental and clinical ALF. Such agents include ammonia, the proinflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) and combinations of the two. Exposure to cultured astrocytes to recombinant IL-1 β (but not ammonia) resulted in increased expression of aquaporin-4 (AQP-4). Both ammonia and proinflammatory mediators led to decreased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a cytoskeletal protein, but these effects were not additive. On the other hand, heme oxygenase-1 (HO-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression were significantly increased by exposure to both ammonia and proinflammatory mediators and although modest, these effects were additive suggestive of a synergistic mechanism. These findings suggest that worsening of brain edema and its complications in ALF due to proinflammatory mechanisms may result from exacerbation of oxidative stress-related mechanisms rather than upregulation of AQP-4 or decreases in expression of the astrocytic structural protein GFAP.

Introduction

Hyperammonemia is a consistent finding in experimental animal models of acute liver failure (ALF) (Mans et al., 1979; Swain et al., 1992a,b) and a significant positive correlation has been reported between arterial ammonia concentrations and the appearance of brainstem herniation in patients with ALF (Clemmesen et al., 1999). Brain ammonia may reach concentrations as high as 5 mM in experimental ALF (Swain et al., 1992a,b) and studies in cultured cortical astrocytes have consistently shown that low millimolar concentrations of ammonia lead to significant cell swelling (Norenberg et al., 2005).

However, it is becoming increasingly evident that ammonia neurotoxicity is not the only pathophysiologic process with the potential to adversely affect cerebral function in ALF. In particular, there is evidence that infection and inflammation also play a significant role. For example, development of infection in patients with ALF is associated with a more rapid progression of hepatic encephalopathy and cerebral edema (Vaquero et al., 2003) and large clinical studies have convincingly shown a higher incidence of infection together with the “systemic inflammatory response syndrome” (SIRS) in ALF patients (Rolando et al., 2000). SIRS is a response to the presence of proinflammatory cytokines such as the interleukins IL-1 and IL-6 and Tumor Necrosis Factor (TNF α) and increased circulating levels of cytokines have been reported in ALF patients (Nagaki et al., 2000). Cytokines are also formed and released by the necrotic liver.

There is evidence to suggest that, in ALF, brain ammonia and proinflammatory cytokines act synergistically to cause brain edema and its complications (intracranial

hypertension, brain herniation) (Blei, 2004). The aims of the present study were to investigate expression of various genes involved in oxidative/nitrosative stress such as heme oxygenase-1 (HO-1), the inducible (iNOS) isoform of nitric oxide synthase, as well as expression of genes involved in cell volume regulation such as the water channel protein aquaporin-4 (AQP-4) and the cytoskeletal protein glial acidic fibrillary protein (GFAP) in cultured cortical astrocytes exposed to ammonia and/or recombinant interleukin-1beta (IL-1 β). The rationale for the choice of IL-1 β was based upon consistent reports of a increase of this cytokine both in experimental and human ALF (Jiang et al., 2009a; Wright et al., 2007).

Materials and methods

Cell Culture

Rat primary cortical astrocyte cultures were prepared according to the method described elsewhere (Chan et al., 2004). Cells were grown in DMEM (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) containing 10% calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) for a total of 3-4 weeks, during which time culture medium was changed twice a week. Confluent cultures were exposed to ammonia (5 mM) and/or recombinant IL-1b (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 24 h.

RNA extraction

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37 °C for 1 h. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -70 °C until use.

Semi-quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) bovine serum albumin, 200 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), *Taq* DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), for a total reaction volume of 50 µL. The reactions were

initially heated at 50°C for 20 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 60°C for 45 sec and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study to ensure all experiments were performed in the exponential phase of amplification where PCR products remain proportional to initial template concentration (data not shown). After amplification, samples were electrophoresed onto 9% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -80°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantified using a β -counter. Omission of AMV reverse transcriptase from the reaction mixture was used as negative control and resulted in absence of amplification. Beta-actin (β -actin) was used as an internal standard to monitor loading variations. Oligonucleotide primers (Table 1) were designed using the PRIMER3 program (Rozen and Skaletsky, 2000) at <http://primer3.sourceforge.net/> and validated using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Gene (Accession #)	Forward/Reverse (5'-3')
β -actin (V01217)	CCAAAGCCTTCATACATC / CATCCCCAAAGTTCTAC
HO-1 (J02722)	CACGCATATACCCGCTACCT / AAGGCGGTCTTAGCCTCTTC
GFAP (U03700)	ACATCGAGATCGCCACCTAC / ACATCACATCCTTGCTGCTCC
iNOS (D44591)	GCCTCCCTCTGGAAAGA / TCCATGCAGACAACCTT
AQP-4 (M1) (U14007)	AGGCGGTGGGGTAAGTGTGGA / ACATCAGTCCGTTTGGAATCAC
AQP-4 (M1+M23) (U14007)	AAGATCAGCATCGCCAAGC / ACATCAGTCCGTTTGGAATCAC

Table 1. Oligonucleotide primers

Statistical Analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM and statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc analysis. A probability of $p < 0.05$ was chosen to establish significance between the groups. Data were analyzed by using Prism 4.0 software (Prism 4.0, San Diego, CA)

Results

Expression of the M1 and M23 isoforms of AQP-4 was decreased 2.6- and 2.7-fold, respectively, in cultured astrocytes exposed to ammonia (Fig. 1). Treatment with recombinant IL-1 β , however, resulted in a 2.5-fold ($p < 0.001$) increase of both AQP isoforms compared with saline-treated controls. Similar increases were obtained following co-exposure to ammonia and IL-1 β .

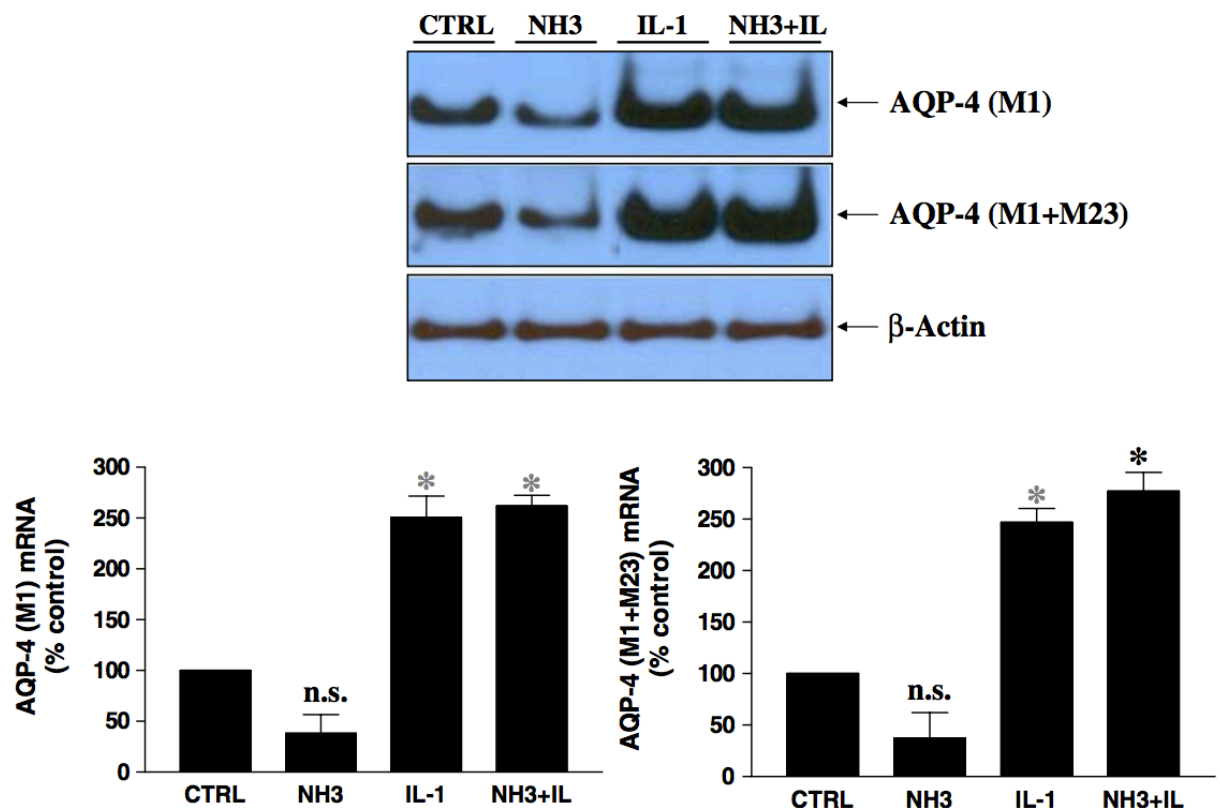


Figure 1. Aquaporin-4 (AQP-4) mRNA expression (M1 and M23 isoforms) (upper panel) in cultured astrocytes exposed to vehicle (CTRL), 5 mM ammonia (NH3), 10 ng/ml interleukin-1 β (IL-1) or a combination of ammonia and interleukin-1 β (NH3+IL) for 24 h. Lower panel: data ($n = 4$ per group) were normalized to β -actin levels and expressed as percentage \pm S.E.M. of controls. (* $p < 0.001$ vs. CTRL by ANOVA; n.s. non-significant).

As expected, exposure of cultured astrocytes to ammonia led to a significant (1.7-fold, $p < 0.01$) decrease in GFAP expression. Exposure to recombinant IL-1 β , on the other hand, resulted in a much stronger downregulation of GFAP expression (8.5-fold, $p < 0.001$). Similar decreases were obtained when cultured astrocytes were exposed to both ammonia and IL-1 β (Fig. 2).

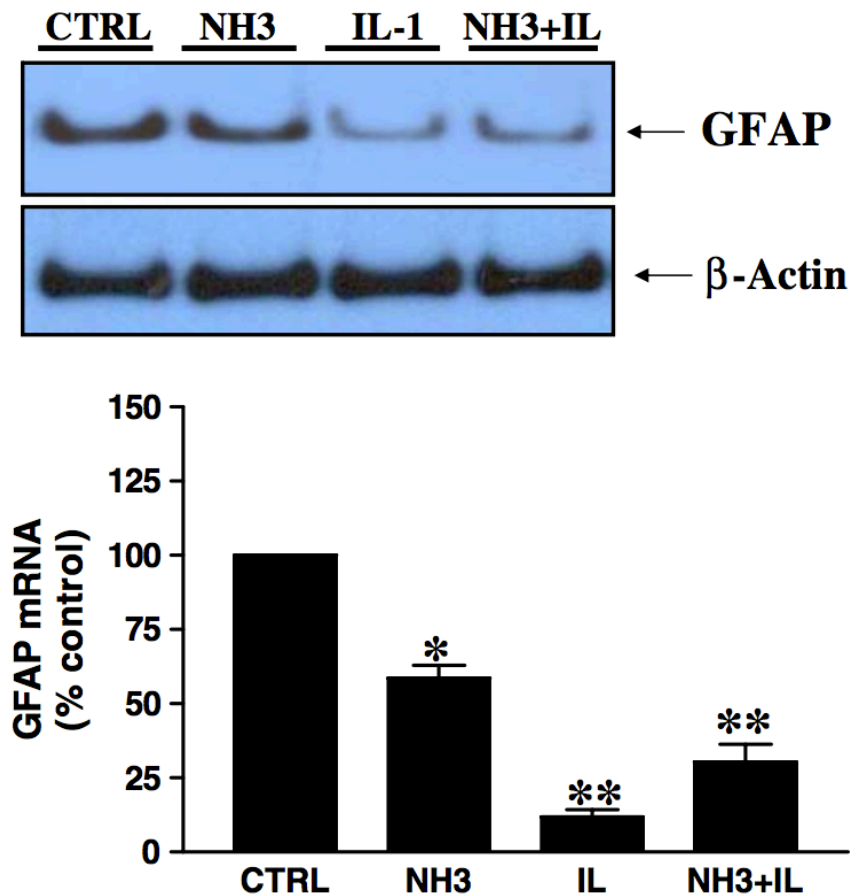


Figure 2. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA expression (upper panel) in cultured astrocytes exposed to vehicle (CTRL), 5 mM ammonia (NH3), 10 ng/ml interleukin-1 β (IL-1) or a combination of ammonia and interleukin-1 β (NH3+IL) for 24 h. Lower panel: data ($n = 4$ per group) were normalized to β -actin levels and expressed as percentage \pm S.E.M. of controls. (* $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ vs. CTRL by ANOVA).

Expression of HO-1 and iNOS were increased 1.5- and 5.6-fold ($p < 0.01$), respectively, following exposure of cultured astrocytes to ammonia (Fig. 3). Exposure to recombinant IL-1 β resulted in a further increase in iNOS expression (10.7-fold over control; $p < 0.001$). Exposure of cultured astrocytes to both ammonia and IL-1 β resulted in an additional increase of both HO-1 (1.7-fold, $p < 0.001$ vs. control) and iNOS (11.7-fold, $p < 0.001$ vs. control).

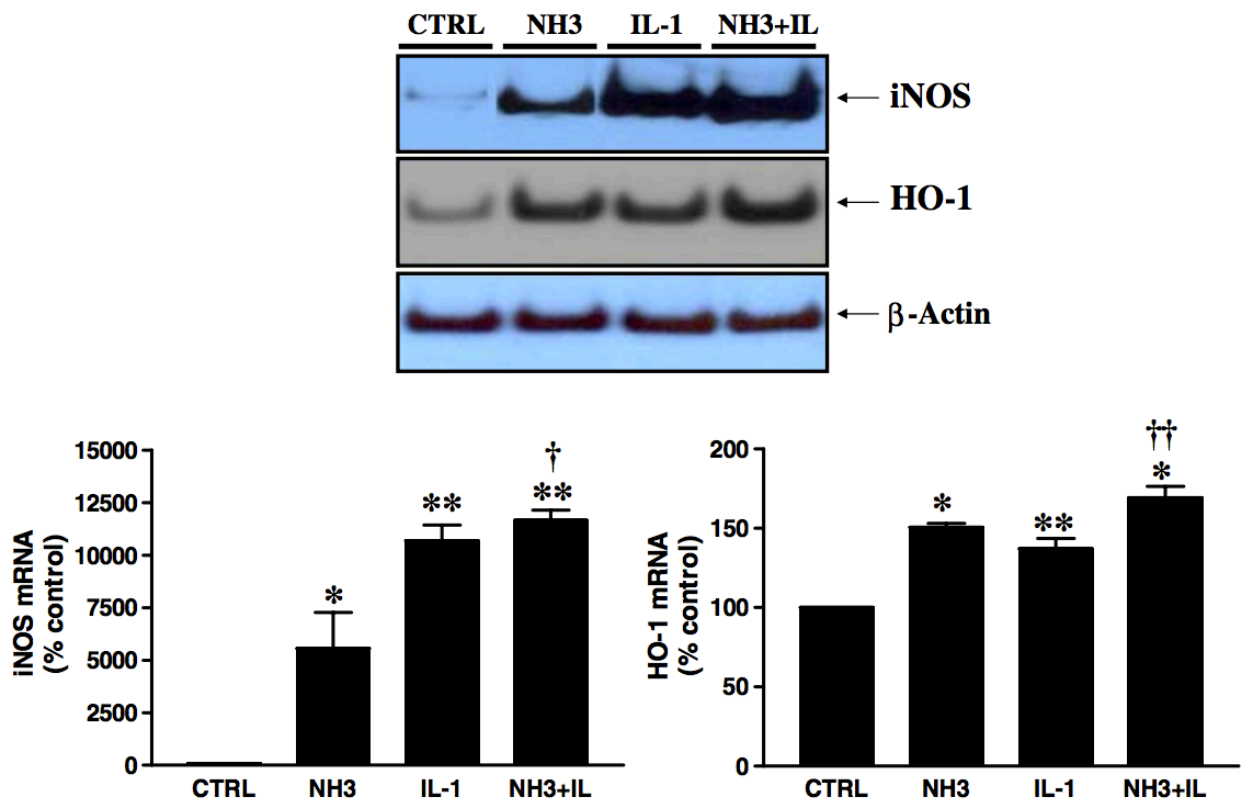


Figure 3. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA expression (upper panel) in cultured astrocytes exposed to vehicle (CTRL), 5 mM ammonia (NH3), 10 ng/ml interleukin-1 β (IL-1) or a combination of ammonia and interleukin-1 β (NH3+IL) for 24 h. Lower panel: data ($n = 4$ per group) were normalized to β -actin levels and expressed as percentage \pm S.E.M. of controls. (* $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ vs. CTRL; † $p < 0.01$ vs. NH3 and †† $p < 0.05$ vs. IL-1 by ANOVA).

Discussion

Exposure of the brain to millimolar concentrations of ammonia results in oxidative stress-related changes including lipid peroxidation (O'Connor and Costell, 1990) and reduced activities of antioxidant enzymes (Kosenko et al., 1999). Studies in cultured cells suggest a role for oxidative/nitrosative stress mechanisms in ammonia-induced cell swelling. For example, antioxidants such as SOD and the spin trapping agent α -phenyl-N-tert-butyl-nitron inhibit ammonia-induced astrocyte swelling. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) is increased in brain in experimental ALF (Jiang et al., 2009b) as well as in cultured cortical astrocytes exposed to ammonia (Schliess et al., 2002) and complete inhibition of ammonia-induced cell swelling has been demonstrated in both cultured astrocytes (Murthy et al., 2000) and brain slices (Zielinska et al., 2003) exposed to the NOS inhibitor L-NAME.

Inflammation causes worsening of encephalopathy and early increases of ICP in ALF patients where the higher ICP, the more marked the inflammatory response as reflected by increased circulating levels of the proinflammatory cytokines TNF α , IL- β , IL6 (Jalan et al., 2004). Circulating or endothelium-derived cytokines have the ability to transduce signals to the brain via vasoactive agents such as NO synthesized from inducible NOS (iNOS), the transcription of which can be increased by proinflammatory cytokines.

Results of the present study reveal that exposure of cultured cortical astrocytes to recombinant IL-1 β results in significant increases in expression of both the M1 and M23 isoforms of the gene coding for the water-channel protein AQP-4. However, in contrast to a

previous report (Rama Rao et al., 2003), exposure of these cells to 5 mM ammonia had no significant effect on expression of AQP-4. These inconsistencies could result from differences in culture media (inclusion of dbcAMP) or duration of exposure to ammonia. These findings, if extrapolated to ALF, suggest that the consistent finding of increased expression of AQP-4 in animal models of ALF due to hepatotoxins such as galactosamine (Eefsen et al., 2009), thioacetamide (Rama Rao and Norenberg, 2007) or resulting from hepatic devascularization (Margulies et al., 1999) most likely results from exposure to proinflammatory cytokines such as IL-1 β , rather than to ammonia. Furthermore, results of the present study suggest that both the M1 and M23 isoforms are implicated in the effects of IL-1 β on AQP-4 expression. The pathophysiologic implications of increased expression of multiple isoforms of AQP-4 remains to be established. However, the finding of no obvious additive effect of exposure to ammonia and IL-1 β on AQP-4 isoform expression observed in the present study suggests that the mechanism responsible for the synergistic effects of ammonia and proinflammatory cytokines mechanisms in the pathogenesis of brain edema in ALF does not involve AQP-4 gene expression. A synergistic effect of ammonia and IL-1 β on plasma membrane trafficking of AQP-4, however, cannot be excluded.

In contrast to the findings for AQP-4, in the case of iNOS, exposure to either ammonia or to IL-1 β both led to significant increases in gene expression. Furthermore, simultaneous exposure to both ammonia and IL-1 β led to increased iNOS gene expression that, although modest, was additive, suggestive of synergism. These findings suggest that nitrosative stress mediated by iNOS-derived NO could be implicated in the pathogenesis of encephalopathy and brain edema in ALF and could explain the phenomenon of worsening

of these symptoms in patients with SIRS. Similar findings of additive effects of ammonia and IL-1 β were observed in the present study in the case of gene coding for the oxidative stress-related protein heme oxygenase-I (HO-1).

GFAP is a cytoskeletal protein and previous studies in both experimental ALF (Bélanger et al., 2002) and in cultured astrocytes exposed to ammonia (Norenberg et al., 1990) reveal that GFAP expression at both the mRNA and protein levels is significantly reduced. It was suggested that loss of GFAP expression due to ammonia exposure was due to instability of the GFAP mRNA (Neary et al., 1994) and that a loss of expression of GFAP due to ammonia could result in altered visco-elastic properties of the cell leading to cytotoxic brain edema (Bélanger et al., 2002).

In summary, exposure of cultured cortical astrocytes to pathologically relevant concentrations of ammonia and IL-1 β results in selective alterations in expression of genes coding for astrocytic proteins with established roles in cell volume regulation. These findings demonstrate that both ammonia and IL-1 β , both independently and in combination, have the potential to cause such changes in gene expression. Moreover, in the case of genes coding for proteins implicated in oxidative/nitrosative stress, there is evidence for additive effects of ammonia and IL-1 β . Future studies will be required in order to address the role of these alterations in gene expression on expression of the relevant proteins in relation to brain edema mechanisms in ALF.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Canadian Institutes for Health Research for the financial support.

References

- Bélangier M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (2002) Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int* 41:155-160
- Blei AT (2004) Infection, inflammation and hepatic encephalopathy, synergism redefined. *J Hepatol* 40:327-330
- Chan H, Butterworth RF, Hazell AS (2004) Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels. *Neurosci Lett* 366:231-234
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P (1999) Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 29:648-653
- Eefsen M, Bisgaard C, Jelnes P, Schmidt LE, Vainer B, Larsen FS (2009) The role of aquaporin-4 and -1 in development of brain edema in experimental liver failure. *Hepatology* 50:398A [abstract]
- Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A (2004) Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* 41:613-620
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2009a) Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:944-952
- Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2009b) Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats. *Neurochem Int* 55:601-605

Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med* 26: 1369-1374

Mans AM, Saunders SJ, Kirsch RE, Biebuyck JF (1979) Correlation of plasma and brain amino acid and putative neurotransmitter alterations during acute hepatic coma in the rat. *J Neurochem* 32:285-292

Margulies JE, Thompson RC, Demetriou AA (1999) Aquaporin-4 water channel is up-regulated in the brain in fulminant hepatic failure. *Hepatology* 30:395a [abstract]

Murthy ChR, Bai G, Dombro RS, Norenberg MD (2000) Ammonia-induced swelling in primary cultures of rat astrocytes: Role of free radicals. *Soc Neurosci Abstr* 26:1893 [abstract]

Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H (2000) High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 182:1103-1108

Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD (1994) Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J Neurochem* 63:2021-2027

Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR (2005) Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 20:303-318

Norenberg MD, Neary JT, Norenberg LO, McCarthy M (1990) Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 49:399-405

O'Connor JE, Costell M (1990) New roles of carnitine metabolism in ammonia cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 272:183-195

Rama Rao KV, Chen M, Simard JM, Norenberg MD (2003) Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport* 14:2379-2382.

Rama Rao KV, Norenberg MD (2007) Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22:265-275

Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R (2000) The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology* 32:734-739

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386

Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D (2002) Ammonia induces MK-801 sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 16:739-741

Swain M, Butterworth RF, Blei AT (1992a) Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15:449-453

Swain, M, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF (1992b) Monitoring of neurotransmitter amino acids by means an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant hepatic failure. *Hepatology* 16:1028-1035

Vaquero J, Chung C, Blei AT (2003) Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol* 2:12-22

Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R (2007) Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* 22:375-388

Zielińska M, Law RO, Albrecht J (2003) Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int* 43:299-303

CHAPITRE 3 :
DISCUSSION GÉNÉRALE

Un nombre croissant d'études cliniques et expérimentales s'accordent pour démontrer que les cytokines pro-inflammatoires et l'ammoniaque jouent un rôle de concert dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA. L'inflammation périphérique et cérébrale est en effet retrouvée à la fois chez les patients atteints d'IHA et dans les modèles animaux, et un intérêt grandissant s'est développé dans le but d'identifier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de l'inflammation dans la survenue des complications neurologiques lors d'IHA *in vivo*. Dans cette thèse, nous avons décidé d'étudier le rôle de l'inflammation lors d'IHA en utilisant une approche expérimentale consistant tour à tour à inhiber ou activer certaines composantes de l'inflammation. Lors d'IHA induite par l'AOM chez la souris, nos résultats démontrent que l'inhibition du TNF- α retarde la progression de l'EH en diminuant les conséquences inflammatoires cérébrales et périphériques tandis que l'induction d'une endotoxémie précipite l'EH et aggrave la pathologie hépatique par l'intermédiaire de mécanismes pro-inflammatoires cérébraux et systémiques. D'autre part, l'ammoniaque et l'IL-1 β induisent *in vitro* des changements d'expression au niveau de gènes astrocytaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire et la survenue du stress oxydatif/nitrosatif.

1. Le rôle de l'inflammation stérile dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë

L'inflammation stérile, par opposition à la réponse inflammatoire induite par les bactéries et leurs produits, est la réponse inflammatoire qui survient lors de dommages cellulaires d'origine non infectieuse. Lors d'IHA d'origine toxique, l'inflammation stérile

survient localement et à distance de la zone lésée et contribue au dommage hépatocellulaire plutôt qu'à la réparation tissulaire.

1.1 Le rôle de l'inflammation systémique dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

L'IHA s'accompagne fréquemment d'une activation des réponses immunitaires systémiques qui jouent un rôle important dans la progression du dommage hépatique et dans l'issue de la pathologie hépatique (Sekiyama *et al.*, 1994; Sheron *et al.*, 2001; Streetz *et al.*, 2000). En particulier, les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes sont augmentés quelle que soit l'étiologie de l'IHA, et sont associés à une instabilité hémodynamique (Sheron *et al.*, 2001), à une augmentation de la PIC (Wright *et al.*, 2007), et à un risque accru de développer un SIRS et par conséquent à une aggravation de l'EH (Rolando *et al.*, 2000). Le SIRS est la manifestation clinique d'une réaction inflammatoire anormale généralisée qui peut survenir lors d'IHA et dans le cas de différentes atteintes graves telles que les brûlures sévères, les polytraumatismes, les chirurgies majeures et la pancréatite (Brun-Buisson 2000; Nystrom 1998; Rolando *et al.*, 2000; Talmor *et al.*, 1999). Sur le plan clinique, le SIRS se caractérise par la présence d'au moins des 2 composantes suivantes : une température corporelle $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$, une fréquence cardiaque > 90 battements/min, une fréquence respiratoire > 20 respirations/min ou une $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg, un taux de leucocytes $> 12000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$. Sur le plan physiopathologique, le SIRS résulte de la libération massive de médiateurs de l'inflammation, dont les cytokines pro-inflammatoires et les ROS, qui provoquent une vasodilatation généralisée, des lésions endothéliales diffuses et une coagulation disséminée. Le SIRS peut conduire *in fine* à un syndrome de détresse respiratoire, une insuffisance

rénale aiguë et une dysfonction multiviscérale (Odeh 2007). Lors d'IHA, la survenue d'un SIRS est une condition dangereuse qui peut précipiter la progression des complications neurologiques et qui est associée à un taux de mortalité élevé. En effet, environ 60% des patients atteints d'IHA développent un SIRS qui est associé à une aggravation de l'EH, à un risque accru de développer un œdème cérébral et une augmentation de la PIC (Rolando *et al.*, 2000). De plus, le risque de mortalité augmente avec le nombre de composantes du SIRS.

Bien que le SIRS reflète une réaction inflammatoire généralisée, une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires n'est pas une caractéristique suffisante pour poser un diagnostic de SIRS qui se définit exclusivement par la présence des composantes énumérées précédemment lors de traumatismes majeurs. Il n'existe donc pas de relation directe entre les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes et la survenue d'un SIRS, même si celles-ci constituent néanmoins un bon indicateur de l'état inflammatoire général (Terregino *et al.*, 1997). Plusieurs études ont ainsi démontré que les taux circulants de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 sont associés à un taux de mortalité élevé chez les patients atteints d'IHA, quelle que soit l'étiologie (Tableau 2).

Référence	Étiologie (nombre de patients)	Cytokine pro-inflammatoire mesurée			Cytokine vs. issue
		IL-1 β	IL-6	TNF- α	
(Izumi <i>et al.</i> , 1994)	APAP (40) Virus/Autre (10)	n.s.	↑	n.a.	IL-6 plus élevée chez les non survivants
(Sekiyama <i>et al.</i> , 1994)	Virus (22) Autre (8)	↑	↑	↑	IL-1 β plus élevée chez les non survivants
(Nagaki <i>et al.</i> , 2000)	Virus (19)	n.a.	n.a.	↑	TNF- α plus élevée chez les non survivants
(Streetz <i>et al.</i> , 2000)	Virus (8) Amanite (4) Autre (10)	n.a.	n.a.	↑	TNF- α plus élevée chez les non survivants
(Sheron <i>et al.</i> , 2001)	APAP (45) Virus (3) Autre (13)	n.a.	↑	↑	IL-6 plus élevée chez les non survivants
(Antoniades <i>et al.</i> , 2006)	APAP (50) Virus (6) Autre (14)	n.a.	↑	↑	IL-6 et TNF- α plus élevées chez les non survivants

Tableau 3 : Études cliniques ayant démontré une corrélation entre les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes et le taux de survie chez les patients atteints d'IHA. APAP, acétaminophène ; n.s. non significatif par rapport au groupe contrôle (témoin) ; n.a., non mesuré. Adapté de (Antoniades *et al.*, 2008), avec la permission de Elsevier BV.

Dans les modèles animaux, les concentrations plasmatiques de TNF- α , IL-6 et IL-1 β sont également augmentées chez le rat ayant subi une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009a), et chez la souris avec une IHA induite par l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010a) ou par l'acétaminophène (Blazka *et al.*, 1995). D'autre part, l'IHA s'accompagne également

d'une élévation des taux circulants de nitrites/nitrates et d'une déplétion des stocks de GSH hépatiques caractéristiques d'un stress oxydatif/nitrosatif (Bemeur *et al.*, 2010a; Jiang *et al.*, 2009b). Dans l'article 1, nous démontrons que l'IHA induite par l'AOM s'accompagne effectivement d'une augmentation des taux circulants de TNF- α , IL-6 et d'un stress oxydatif/nitrosatif au niveau hépatique (Article 1, Table 1). Nos résultats vont plus loin et démontrent notamment que cette augmentation de cytokines pro-inflammatoires circulantes survient rapidement après l'induction de l'IHA et plafonne jusqu'au stade coma, ce qui suggère que les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle précoce dans la survenue de l'EH mais ne sont pas directement responsables de la survenue du coma. D'autre part, l'augmentation des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires précède la survenue de la nécrose massive des hépatocytes et de l'hyperammonémie, qui ne surviennent qu'au stade coma, ce qui suggère que les cytokines pro-inflammatoires, si elles jouent un rôle dans la survenue du coma, le font conjointement avec l'ammoniaque.

1.2 Le rôle du TNF- α périphérique dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

Le TNF- α est considéré comme le chef de file de la réaction inflammatoire car il initie et coordonne le processus inflammatoire, et induit notamment la synthèse de l'IL-6 et de l'IL-1 β . Plusieurs études démontrent ainsi que le TNF- α est impliqué dans la pathogenèse de l'IHA de différentes étiologies chez l'homme et dans les modèles animaux (Bernal *et al.*, 1998; Streetz *et al.*, 2000). En particulier, les expressions intrahépatique et plasmatique du TNF- α et de ses récepteurs TNFR1 et TNFR2 sont augmentées chez les patients atteints d'IHA et sont corrélées au degré de nécrose des hépatocytes, à la progression de la maladie hépatique et à un taux de mortalité élevé (Streetz *et al.*, 2000).

L'implication physiopathologique de cette augmentation plasmatique des récepteurs solubles du TNF- α n'est pas connue mais pourrait constituer une voie endogène limitant les effets biologiques du TNF- α , ou bien contribuer à la progression de l'IHA en stabilisant la molécule. En faveur de cette dernière hypothèse, il est intéressant de noter que les taux circulants de TNF- α et de ses récepteurs sont augmentés et corrélés à la survenue de l'EH et du coma hépatique chez les patients atteints d'IHA consécutive à une intoxication à l'acétaminophène (Rolando *et al.*, 1995). En outre, la vaste majorité des études chez l'homme atteint d'IHA démontre que les taux circulants de TNF- α sont augmentés et plus élevés chez les patients décédés que chez ceux qui ont survécu (Antoniades *et al.*, 2006; Nagaki *et al.*, 2000; Streetz *et al.*, 2000) et l'élimination artificielle du TNF- α plasmatique par la technique MARS est associée à une amélioration de l'état clinique et à un taux de survie augmenté (Guo *et al.*, 2003).

Dans les modèles expérimentaux, plusieurs études démontrent que le TNF- α joue un rôle important dans les complications neurologiques lors d'IHA. En effet, les taux plasmatiques de TNF- α sont augmentés lors du coma hépatique chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009a) et sont corrélés à la fréquence de survenue et à la sévérité de l'EH chez le rat avec une IHA induite par le thioacétamide (Chu *et al.*, 2001). Cependant, il existe des divergences concernant le rôle du TNF- α dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA induite par une intoxication à l'acétaminophène. En effet, les taux plasmatiques de TNF- α sont rapidement augmentés après l'injection d'acétaminophène chez la souris mais l'administration d'anticorps dirigés contre le TNF- α est soit hépatoprotectrice (Blazka *et al.*, 1995) soit sans effet (Simpson *et al.*, 2000), et

l'atteinte hépatique est similaire chez les souris KO pour le TNF- α et les souris sauvages (Boess *et al.*, 1998). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats divergents, notamment le protocole expérimental mis en place pour chaque étude (dose d'acétaminophène, mise à jeun, contrôle de la température, âge des souris) et la souche des souris puisque le polymorphisme des gènes codant pour le TNF- α peut jouer un rôle important dans la physiopathologie hépatique (Bernal *et al.*, 1998). D'autre part chez la souris avec une IHA induite par l'AOM, les taux de TNF- α sont également augmentés mais la délétion du gène codant pour TNFR1 diminue le dommage hépatique et retarde à la fois la progression de l'EH et la survenue du coma (Bemeur *et al.*, 2010a; Bemeur *et al.*, 2010b). En outre, nous démontrons dans ce même modèle que l'administration périphérique d'etanercept, un récepteur soluble au TNF- α , retarde la progression de l'EH et réduit le dommage hépatique (Article 1, Figures 1 et 2, Table 2). S'agissant des mécanismes impliqués, l'inhibition du TNF- α réduit l'inflammation périphérique et cérébrale ainsi que le stress oxydatif/nitrosatif au niveau hépatique et cérébral, ce qui conforte un rôle important du TNF- α dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA induite par l'AOM (Article 1, Figures 3, 4 et 6).

L'etanercept n'est cependant efficace que pendant une fenêtre thérapeutique inférieure à 6 h après l'induction de l'IHA, alors même que la réaction inflammatoire systémique n'est pas encore détectable (Article 1, Table 1). Ce résultat suggère d'une part que le TNF- α intrahépatique joue un rôle précoce dans la physiopathologie de l'IHA et dans le développement de l'inflammation systémique, et d'autre part que le dommage hépatocellulaire causé par l'inflammation locale est déjà trop avancé et ne peut plus être atténué 6 h après le début de l'IHA. L'efficacité thérapeutique de l'etanercept dépend donc

de son administration rapide lors d'IHA. Enfin, l'etanercept retarde également la progression de la pathologie hépatique et l'inflammation périphérique chez la souris avec une IHA induite par l'acétaminophène, ce qui suggère qu'il pourrait constituer une approche thérapeutique lors d'IHA d'étiologies variées.

2. Le rôle de l'inflammation infectieuse dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë

Le SIRS peut constituer la première étape d'une dégradation immunologique qui peut mener successivement à la septicémie, la septicémie sévère, au choc septique et à la dysfonction multiviscérale. La progression au travers de ces différents états reflète la perte de contrôle progressive de la réponse immunitaire qui favorise la survenue d'infections (Bone 1996). Lorsque le SIRS est associé à une infection, on parle alors de septicémie. Lors d'IHA, 50 à 90 % des patients développent une infection en raison, d'une part, des troubles immunologiques qu'ils développent (Introduction, Section 3.2.2), et d'autre part des soins invasifs que requiert leur condition et qui les prédisposent aux infections (Rolando *et al.*, 1990; Rolando *et al.*, 2000; Vaquero *et al.*, 2003). La pose d'un cathéter ou l'aspiration trachéale par exemple constituent des voies d'entrée pour les pathogènes, et les sites d'infection les plus communs sont le sang, les voies respiratoires et urinaires, et la cavité péritonéale (Rolando *et al.*, 1990; Vaquero *et al.*, 2003). Les infections peuvent être d'origine bactérienne ou fongique, et la présence de bactéries Gram-négatives ou Gram-positives résulte en un degré similaire de SIRS chez les patients atteints d'IHA (Rolando *et al.*, 2000; Vaquero *et al.*, 2003). De plus, une augmentation des niveaux plasmatiques de LPS, un composant bactérien des bactéries Gram-négatives, est fréquente chez les patients

atteints d'IHA et est associée à une incidence accrue de la coagulopathie, de l'insuffisance rénale aiguë et de l'EH (Iwai *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1974).

Comme nous l'avons vu précédemment, le SIRS est une condition dangereuse qui est retrouvée chez 60% des patients atteints d'IHA, quelle que soit l'étiologie, et qui peut précipiter la progression des complications neurologiques. Lors d'IHA, le SIRS peut être une conséquence de l'inflammation hépatique *per se* ou avoir une origine infectieuse et parmi les 60% des patients atteints d'IHA qui développent un SIRS, la grande majorité présente un SIRS d'origine infectieuse (Rolando *et al.*, 2000). Pour un même nombre de composantes de SIRS, le risque d'une aggravation de l'EH est identique chez les patients atteints d'IHA infectés et non infectés. Cependant les patients infectés ont non seulement un risque plus grand de développer un SIRS que les patients non infectés, mais également un SIRS plus sévère avec une aggravation subséquente de l'EH et un taux de mortalité plus élevé (Rolando *et al.*, 2000; Vaquero *et al.*, 2003). La survenue d'infections, qui est une complication fréquente lors d'IHA, est donc associée à un risque accru de développer un SIRS et une aggravation de l'EH. La détection rapide d'une infection et l'administration d'antibiotiques à large spectre pourraient donc apparaître comme des moyens thérapeutiques de retarder la progression de l'EH lors d'IHA. Cependant des études précédentes ont démontré une efficacité contrastée des antibiotiques (Rolando *et al.*, 1993; Rolando *et al.*, 1996; Salmeron *et al.*, 1992). En effet, si la prévalence des infections est diminuée lors d'une antibiothérapie chez les patients atteints d'IHA, le taux de mortalité associé reste inchangé, ce qui suggère que c'est la réponse inflammatoire systémique qui conditionne le pronostic vital lors d'IHA. De études complémentaires sont cependant nécessaires pour réévaluer l'opportunité d'un traitement antibiotique en prophylaxie et pour établir les mécanismes inflammatoires sous-jacents.

Aucune étude expérimentale n'a été menée à ce jour dans le but d'étudier l'effet d'une infection lors d'IHA, et la plupart des informations actuelles repose sur les modèles d'endotoxémie et des modèles d'IHA basés sur l'injection d'une hépatotoxine *et* de LPS, dont le but est non pas d'évaluer les effets spécifiques du LPS lors d'une IHA, mais de réduire la variabilité du modèle d'IHA résultant des propriétés intrinsèques de l'hépatotoxine et d'assurer la létalité. Ces modèles d'IHA ne sont pas reconnus par la commission ISHEN comme des modèles d'EH de type A (Butterworth *et al.*, 2009). Compte tenu du rôle prépondérant de la réponse inflammatoire systémique lors d'IHA, nous nous sommes donc intéressés au rôle d'une endotoxémie non létale induite par le LPS dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA induite par l'AOM chez la souris, modèle reconnu d'EH de type A.

Nos résultats démontrent tout d'abord qu'une très faible dose de LPS précipite la progression de l'EH et la survenue du coma lors d'IHA, et accélère et aggrave la pathologie hépatique en augmentant notamment le recrutement des neutrophiles au foie (Article 2, Figures 2 et 3). Ce résultat confirme d'une part que la réponse inflammatoire hépatique joue un rôle majeur dans la progression de la pathologie et suggère d'autre part une hypersensibilité du foie nécrotique au LPS lors d'IHA. En effet, il a été démontré que la galactosamine (Galanos *et al.*, 1979) et l'amatoxine (Takada *et al.*, 2001) sensibilisent le foie à l'injection de LPS et augmentent le dommage hépatique *via* des mécanismes pro-inflammatoires (Sass *et al.*, 2001; Sass *et al.*, 2002). D'autre part dans les modèles d'endotoxémie, il a été démontré que 80% du LPS injecté en intraveineuse est rapidement concentré au niveau du foie où il est détoxifié principalement par les hépatocytes et les cellules de Kupffer (Ruiter *et al.*, 1981; Zlydaszyk and Moon 1976). L'activation des cellules de Kupffer et la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β , induites à la fois par le LPS et en

réponse au dommage hépatique lors d'IHA, pourraient ainsi contribuer à une augmentation de la capture du LPS par les hépatocytes, à une augmentation de l'inflammation locale et à une amplification de la nécrose hépatique (Means *et al.*, 2000; Pastor and Billiar 1995).

La réponse inflammatoire périphérique est amplifiée par le LPS lors d'IHA au stade coma comme le démontre l'augmentation plus importante des concentrations plasmatiques en TNF- α , IL- β et IL-6 par rapport à celles observées lors d'IHA seule (Article 2, Figure 4). Il est intéressant de constater que la faible dose de LPS injectée n'induit pas de réponse inflammatoire systémique, ce qui suggère une synergie entre les mécanismes pro-inflammatoires systémiques induits par le LPS et l'IHA dans notre modèle. Par ailleurs, bien qu'il soit évidemment difficile de déterminer si l'administration de LPS et l'induction de l'IHA résultent en l'apparition d'un SIRS infectieux au sens strict dans notre modèle, le fait que les concentrations en cytokines pro-inflammatoires systémiques soient plus élevées en présence de LPS qu'en absence de LPS lors d'IHA témoigne d'un degré d'inflammation systémique plus important lors d'endotoxémie. Le degré d'inflammation systémique semble en effet être un facteur déterminant dans la progression du SIRS vers le choc septique et la dysfonction multiviscérale chez les patients atteints d'IHA (Antoniades *et al.*, 2008), et l'amplitude de la réponse inflammatoire est corrélée à la défaillance organique et à un taux de mortalité élevé lors d'un choc septique (Martin *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1997). D'autre part, nous démontrons que les taux d'IL-6 cérébraux sont également augmentés par le LPS lors d'IHA ce qui suggère que la transmission inflammatoire foie-cerveau pourrait être augmentée lors d'endotoxémie et notamment *via* une augmentation de la perméabilité de la BHE (Article 2, Figure 6).

Compte tenu des résultats obtenus avec l'etanercept et ceux obtenus en condition d'endotoxémie, il pourrait être intéressant de comparer les effets de l'administration de TNF- α ou de LPS chez la souris avec une IHA induite par l'AOM. Cette approche pourrait permettre d'identifier d'une part les effets du TNF- α dans les conditions physiologiques et lors d'IHA et d'autre part d'identifier les mécanismes physiopathologiques propres à l'inflammation stérile de ceux induits par le LPS lors d'IHA. D'autre part, il pourrait être intéressant de tester l'effet de l'etanercept en condition d'endotoxémie afin de poursuivre l'étude de son potentiel thérapeutique.

Par ailleurs, l'évolution du SIRS vers la septicémie et la défaillance multiorganique apparaît de plus en plus comme le résultat d'un déséquilibre entre les réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Longtemps considérée comme l'élément charnière, il devient aujourd'hui évident que la réponse pro-inflammatoire joue certes un rôle important dans le SIRS mais que c'est l'absence de régulation adéquate des signaux pro-inflammatoires par la réponse anti-inflammatoire qui conduit à l'apparition successive d'un syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire puis à la dissonance immunologique et à la défaillance multiorganique (Bone 1996). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les taux circulants d'interleukine-10, une cytokine anti-inflammatoire majeure, sont corrélés à un taux de mortalité élevé chez les patients atteints d'IHA (Antoniades *et al.*, 2006; Nagaki *et al.*, 2000; Yumoto *et al.*, 2002). Une meilleure compréhension de l'évolution des profils pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours de l'IHA s'avère donc nécessaire pour poser les bases d'une immunothérapie chez les patients.

3. Les mécanismes cérébraux inflammatoires impliqués dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique lors d'insuffisance hépatique aiguë

3.1 La neuroinflammation et la signalisation foie-cerveau lors d'IHA

L'activation de la microglie et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires cérébrales sont observées lors d'IHA à la fois chez les patients (Butterworth 2011; Wright *et al.*, 2007) et chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009a), et des évidences suggèrent que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires circulantes jouent un rôle conjoint dans la neuroinflammation lors d'IHA. En effet, l'infusion continue d'ammoniaque chez le rat induit une activation de la microglie (Rodrigo *et al.*, 2010) tandis que les taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes sont corrélées à la progression de l'EH et à la survenue du coma chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009a). D'autre part, une étude récente en microscopie à deux photons *in vivo* démontre que l'activation de la microglie survient uniquement au stade coma de l'EH lors d'IHA induite par l'AOM, alors que l'administration systémique aiguë d'ammoniaque n'induit pas d'activation microgiale (Rangroo Thrane *et al.*, 2012). Ce résultat démontre que l'ammoniaque seul n'est pas responsable de ce changement d'activité et suggère que d'autres facteurs, tels que les cytokines pro-inflammatoires périphériques, jouent un rôle important dans l'activation de la microglie au stade coma lors d'IHA. Nos résultats de l'article 1 démontrent que les cytokines pro-inflammatoires circulantes sont augmentées rapidement lors d'IHA induite par l'AOM et plafonnent jusqu'au coma, stade à partir duquel on note l'apparition de l'hyperammonémie (Article 1, Table 1). Si l'on met les résultats de ces deux études en

perspective, nous pouvons supposer que les cytokines pro-inflammatoires circulantes pourraient sensibiliser et augmenter la perméabilité de la BHE jusqu'au stade coma et permettre alors un passage facilité de l'ammoniaque et/ou du signal inflammatoire vers le cerveau, résultant en l'activation de la microglie. En effet, il est connu que les cytokines pro-inflammatoires, et en particulier le TNF- α , augmentent la perméabilité des cellules endothéliales cérébrales et le passage transcellulaire, ce qui favorise la signalisation pro-inflammatoire au cerveau (Duchini *et al.*, 1996).

D'autre part nous démontrons dans l'article 1 que l'inhibition périphérique du TNF- α chez la souris avec une IHA induite par l'AOM, diminue l'activation de la microglie et la concentration d'IL-6 cérébrale au stade coma ce qui conforte l'hypothèse que les cytokines pro-inflammatoires systémiques, notamment le TNF- α , jouent un rôle important dans la neuroinflammation lors d'IHA (Article 1, Figure 4). Puisque l'etanercept n'est pas retrouvé au niveau cérébral (Article 1, Figure 5), la BHE reste globalement intacte dans notre modèle et l'inhibition périphérique du TNF- α pourrait ainsi diminuer la signalisation inflammatoire foie-cerveau (Introduction, section 4.1.3), réduire le recrutement et l'infiltration des monocytes au cerveau (D'Mello *et al.*, 2009), et diminuer la perméabilité de la BHE à l'ammoniaque (Duchini *et al.*, 1996).

Enfin dans l'article 2, nous démontrons que l'endotoxémie chez la souris avec une IHA induite par l'AOM induit une réponse inflammatoire systémique supérieure à celle observée en condition non infectieuse, qui résulte en une concentration supérieure en IL-6 cérébrale (Article 2, Figures 4 et 7). En particulier, le degré d'activation de la réponse systémique lors d'IHA en condition infectieuse est si important qu'il s'accompagne d'une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE avec une extravasation des IgG

(Article 2, Figure 6) ce qui suggère que le passage des cytokines pro-inflammatoires systémiques et du LPS au niveau cérébral pourrait être augmenté et contribuer à un degré accru de neuroinflammation.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'inflammation périphérique joue un rôle majeur dans la signalisation foie-cerveau et dans la survenue de la neuroinflammation lors d'IHA. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour identifier précisément les voies de signalisation au cerveau impliquées lors d'IHA, notamment dans les conditions non infectieuses. Dans ce but, la comparaison entre l'injection systémique et cérébrale de l'etanercept au niveau de la progression de l'EH lors d'IHA, et l'étude de la progression de l'IHA chez des souris KO pour les récepteurs au TNF- α ou à l'IL-1 β au niveau de différents types cellulaires cérébraux par exemple, constituent quelques unes des voies d'études qu'il serait intéressant d'explorer afin d'identifier les mécanismes sous-jacents de la neuroinflammation lors d'IHA. D'autre part, il pourrait être intéressant de préciser le rôle respectif des astrocytes réactifs et de la microglie activée dans la neuroinflammation lors d'IHA en réalisant des études immunohistochimiques *in vivo* de colocalisation entre les cytokines pro-inflammatoires cérébrales et les marqueurs cellulaires adéquats (GFAP, OX-42).

3.2 La barrière hémato-encéphalique et le rôle des métalloprotéinases matricielles dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

Lors d'IHA, la vaste majorité des études démontre que la BHE reste globalement intacte et que l'œdème cérébral qui peut survenir est d'origine cytotoxique (Chavarría *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 1992; Ranjan *et al.*, 2005). Cependant des études récentes suggèrent des changements subtils de la perméabilité de la BHE lors d'IHA impliquant notamment

des modifications de l'expression des protéines des JS telles que ZO-2 (Shimajima *et al.*, 2008) et l'occludine (Lv *et al.*, 2010). S'agissant des mécanismes impliqués, certaines études suggèrent un rôle des MMPs dans la dégradation enzymatique des JS. En particulier, il a été démontré une corrélation entre l'augmentation des taux plasmatiques de MMP-9 activée et l'augmentation de la perméabilité au bleu Evans au stade coma d'IHA chez la souris traitée à l'AOM (Nguyen *et al.*, 2006), et l'expression cérébrale de MMP-9 est associée à l'augmentation de la PIC et à l'extravasation de bleu Evans chez le rat traité à la galactosamine (Cauli *et al.*, 2011). De plus, une diminution de l'expression de la claudine-5 et de l'occludine est également observée par certains chez la souris traitée à l'AOM, et elle est corrélée à l'activation de MMP-9. Nous nous sommes donc intéressés au niveau d'expression des JS et à l'activité des MMPs lors d'IHA induite par l'AOM. Nous démontrons par deux fois que l'expression des JS n'est pas modifiée dans notre modèle (Article 3, Figure 2 ; Article 2, résultats non montrés). Cette divergence par rapport aux études précédentes pourrait être expliquée par une différence d'hépatotoxine utilisée dans les modèles ou par un contrôle insuffisant de la température des animaux par exemple, qui pourraient résulter en une variabilité dans les résultats obtenus (Article 3). D'autre part, nous démontrons que l'activité cérébrale de MMP-9 est augmentée lors d'IHA ce qui suggère que MMP-9 joue un rôle dans les mécanismes physiopathologiques qui n'impliquent pas la digestion des JS, mais possiblement d'autres composants de la BHE comme la membrane basale par exemple (Article 2, Figure 5). L'activité de MMP-9 est augmentée précocement lors d'IHA et elle est maintenue jusqu'au stade coma de l'EH ce qui suggère que MMP-9, dont l'activité est régulée par les signaux pro-inflammatoires, joue un rôle important dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA induite par l'AOM mais n'est pas le seul facteur impliqué. En outre, le fait que l'activité de MMP-9 soit augmentée

au niveau cérébral suggère que cette enzyme exerce son effet localement et qu'elle est activée par des signaux pro-inflammatoires cérébraux tels que les cytokines pro-inflammatoires et les ROS (Heo *et al.*, 2005; Mun-Bryce and Rosenberg 1998) dont l'origine peut provenir de la microglie activée et des astrocytes réactifs (Gottschall and Deb 1996). On peut également supposer que l'activation de MMP-9 cérébrale se fait par le biais de l'endothélium vasculaire cérébral et qu'elle implique l'ammoniaque périphérique et les cytokines pro-inflammatoires circulantes. En effet, l'endothélium exprime également MMP-9 (Cunningham *et al.*, 2005), et il a été démontré récemment que l'ammoniaque peut induire une augmentation de l'activité de MMP-9 dans des cellules endothéliales en culture *via* des mécanismes impliquant le stress oxydatif/nitrosatif (Skowronska *et al.*, 2012). D'autre part, puisque MMP-9 est régulée par les signaux pro-inflammatoires et que son activité suit le degré d'inflammation systémique dans notre modèle, l'activation de MMP-9 pourrait se faire de façon indirecte *via* l'activation de l'endothélium vasculaire, en réponse aux cytokines pro-inflammatoires circulantes. Cependant, l'hypothèse selon laquelle la MMP-9 circulante en provenance du foie nécrotique pourrait jouer un rôle dans l'EH lors d'IHA reste controversée puisque chez les patients son augmentation n'est pas corrélée à l'augmentation de la PIC. De plus, nous ne démontrons pas d'extravasation significative des IgG (25 kDa) lors d'IHA induite par l'AOM ce qui suggère que MMP-9 (92 kDa) ne peut traverser la BHE et exercer un effet au niveau cérébral (Nguyen *et al.*, 2006; Palenzuela *et al.*, 2010) (Article 2, Figure 6). Enfin, ces résultats confortent les nombreuses études menées chez l'homme atteint d'IHA qui démontrent que l'œdème cérébral qui peut survenir lors d'IHA est d'origine cytotoxique puisque l'intégrité des JS est maintenue (Chavarria *et al.*, 2010; Ranjan *et al.*, 2005). L'activation spécifique de MMP-9, par opposition à MMP-2 dont la régulation n'est pas soumise aux mécanismes inflammatoires,

suggère que les mécanismes pro-inflammatoires systémiques et cérébraux jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA cependant le rôle de MMP-9 reste encore à préciser notamment en l'absence d'endotoxémie. A cet effet, il serait pertinent d'étudier l'effet de l'inhibition de MMP-9, au niveau périphérique et/ou cérébral chez la souris avec une IHA induite par l'AOM. Il est en effet établi que MMP-9 joue un rôle important dans plusieurs processus pathologiques hépatiques et notamment dans l'infiltration des neutrophiles lors d'ischémie/reperfusion (Hamada *et al.*, 2008) et lors de la régénération hépatique (Olle *et al.*, 2006). Les résultats de cette étude permettraient ainsi d'établir le rôle propre de MMP-9 au niveau hépatique et cérébral lors d'IHA expérimentale.

L'endotoxémie induit une augmentation accrue de l'activité de MMP-9 cérébrale lors d'IHA qui s'accompagne d'une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE avec une extravasation des IgG au niveau cérébral (Article 2, Figures 5 et 6). Ce résultat démontre pour la première fois que les infections peuvent précipiter la survenue de l'EH et du coma hépatique lors d'IHA *via* des mécanismes vasogéniques et induire la libre diffusion d'une multitude de composés en provenance de la périphérie. En particulier, le passage au niveau cérébral du LPS et des cytokines pro-inflammatoires systémiques, dont la synthèse est également augmentée lors d'endotoxémie, pourrait contribuer à l'augmentation de la neuroinflammation observée (Article 2, Figure 7). De façon remarquable, cette augmentation massive de la perméabilité est uniquement retrouvée lors d'endotoxémie ce qui suggère que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents lors d'IHA en conditions infectieuses et non infectieuses sont différents (Article 2, Figure 6 ; Article 3, Figure 1). Par la suite, il serait donc intéressant d'inhiber MMP-9 au niveau

périphérique et/ou cérébral en condition d'endotoxémie afin d'une part de confirmer le rôle important de MMP-9 que nous observons dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE et d'autre part de clarifier les mécanismes physiopathologiques hépatiques et cérébraux relatifs à MMP-9 et d'éventuellement mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique.

De plus, les premiers résultats de notre étude suggèrent qu'en condition d'endotoxémie, l'EH qui se développe lors d'IHA partage plusieurs des caractéristiques de l'encéphalopathie septique avec notamment le développement d'une réaction inflammatoire systémique et cérébrale importante et une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE (Clawson *et al.*, 1966; Papadopoulos *et al.*, 2000). Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer ces observations. En particulier, il serait intéressant d'avoir recourt à d'autres traceurs de différents poids moléculaires (fluorescéine dextran-FITC (40 kDa), Bleu Evans-albumine (69 kDa)) pour nous permettre d'une part de valider nos résultats et d'autre part d'évaluer le degré de perméabilité de la BHE. Cependant, certaines mises au point techniques seront nécessaires pour contourner les difficultés connues de l'injection intraveineuse rencontrées au cours du modèle d'IHA chez la souris traitée à l'AOM (coagulation disséminée et concentration sanguine excessive au niveau hépatique notamment). Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de la minocycline lors d'endotoxémie chez la souris atteinte d'IHA. En effet, cet antibiotique de la famille des tétracyclines inhibe spécifiquement l'activation microgliale et a déjà démontré son efficacité à diminuer la neuroinflammation chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009c). Compte tenu des résultats contrastés des différentes antibiothérapies lors d'infections chez l'homme atteint d'IHA, la minocycline

pourrait constituer une antibiothérapie efficace lors d'endotoxémie et mettre en évidence certains des mécanismes physiopathologiques impliqués.

3.3 Le rôle du stress oxydatif/nitrosatif dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

Le stress oxydatif/nitrosatif et l'inflammation sont étroitement liés (Laroux *et al.*, 2001) et plusieurs évidences démontrent que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle conjoint dans le stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA. Dans les modèles animaux d'IHA, on observe une activation de la microglie qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression cérébrale de NOSe, NOSi et HO-1 chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009b; Sawara *et al.*, 2009) de même qu'une augmentation des niveaux cérébraux de nitrites/nitrates et de ROS chez le rat traité au thioacétamide (Sathyasaikumar *et al.*, 2007), et une diminution des taux cérébraux de GSH chez la souris injectée avec l'AOM (Bemeur *et al.*, 2010a). La relation précise entre l'inflammation et le stress oxydatif/nitrosatif n'est pas clairement établie mais l'administration de minocycline diminue l'activation microgliale, les taux de cytokines pro-inflammatoires cérébrales et le stress oxydatif/nitrosatif cérébral chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009c). Dans l'article 1, nous démontrons également que l'administration d'étanercept retarde la progression de l'EH, diminue l'activation microgliale, les taux d'IL-6 cérébraux et prévient l'oxydation du GSH lors d'IHA induite par l'AOM (Article 1, Figure 6). L'ensemble de ces résultats démontre que l'inflammation et le stress oxydatif/nitrosatif partagent effectivement des mécanismes communs dans la physiopathologie l'EH lors d'IHA, cependant le rôle propre des cytokines pro-inflammatoires reste peu connu.

Les études révèlent un rôle majeur de l'ammoniaque dans l'induction du stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA. En effet, l'infusion d'ammoniaque chez le rat inhibe l'activité d'enzymes anti-oxydantes cérébrales dont la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase, et s'accompagne d'une augmentation de la peroxydation lipidique et de la nitration protéique, ainsi que d'une déplétion du GSH (Kosenko *et al.*, 1997; Schliess *et al.*, 2002). Les astrocytes sont une source majeure de stress oxydatif/nitrosatif et l'analyse immunohistochimique de coupes de cerveau de rat ayant reçu une infusion d'ammoniaque révèle une colocalisation entre les protéines nitrosylées et le marqueur astrocytaire GFAP (Gorg *et al.*, 2003; Gorg *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002). D'autre part, ce n'est que très récemment avec la découverte de la neuroinflammation et de l'activation de la microglie lors d'IHA (Butterworth 2011; Jiang *et al.*, 2009a) que la microglie est également apparue comme une source importante de stress oxydatif/nitrosatif. L'implication des cytokines pro-inflammatoires cérébrales dans les mécanismes de stress oxydatif/nitrosatif n'est cependant que suggérée par des évidences indirectes basées sur l'administration *in vivo* de minocycline (Jiang *et al.*, 2009b) et d'étanercept (Article 1) dans les modèles d'IHA, et par l'augmentation des taux de protéines nitrosylées dans des cultures d'astrocytes exposées à des concentrations physiopathologiques de TNF- α (Gorg *et al.*, 2006) Dans l'article 4, nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'IL-1 β et de l'ammoniaque dans la régulation de l'expression de NOSi et de HO-1, deux marqueurs de stress oxydatif/nitrosatif. Nous démontrons que les niveaux d'expression de NOSi et de HO-1 sont significativement augmentés par des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque ou d'IL-1 β et augmentés de surcroît lors d'un traitement combiné ce qui suggère un mécanisme synergique (Article 4, Figure 3). Ces résultats concernent les

niveaux d'expression des ARNm codant pour NOSi et HO-1 ce qui ne présume pas d'un effet au niveau protéique, cependant les expressions de NOSi et de HO-1 sont également augmentées, au niveau de la protéine et de l'ARNm, chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009b). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les cytokines pro-inflammatoires induisent directement un stress oxydatif/nitrosatif cérébral.

Lors d'IHA, l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires, en provenance de la périphérie ou produites localement par la microglie activée et les astrocytes réactifs, peuvent donc jouer un rôle conjoint dans les mécanismes de stress oxydatif/nitrosatif et entraîner *in fine* la perturbation des fonctions astrocytaires et microgliales qui contribuent au développement des complications neurologiques lors d'IHA. Il pourrait être intéressant d'étudier par la suite plus en détail le rôle du stress oxydatif/nitrosatif et des effets vasodilatateurs des cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'endothélium de la BHE, puisque certaines études démontrent un changement de perméabilité lors d'IHA. En effet, les expressions cérébrales et plasmatiques de NOSe et de NOSi sont augmentées chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Jiang *et al.*, 2009b) et des études démontrent un rôle important de ces différents isoformes dans les mécanismes de rupture de la BHE notamment lors d'ischémie cérébrale (Mohammadi *et al.*, 2011), d'encéphalopathie auto-immune (Wu and Tsirka 2009) et d'encéphalopathie septique (Handa *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que l'activation de NOSe et de NOSi est associée à une augmentation du transport du LPS au niveau cérébral (Banks *et al.*, 2008) ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la neuroinflammation. L'ensemble de ces mécanismes pourrait être impliqué dans la physiopathologie des complications neurologiques et de l'EH lors d'IHA, notamment lors d'endotoxémie.

3.4 Le gonflement astrocytaire dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA

L'accumulation de glutamine au niveau de l'astrocyte, résultant de la détoxification de l'ammoniaque en glutamine *via* la GS, exerce un effet osmotique et entraîne un mouvement d'eau du parenchyme cérébral vers l'intérieur de la cellule (Albrecht and Dolinska 2001). Ce mécanisme est supporté par le fait que la méthionine sulfoximine, un inhibiteur irréversible de la GS, prévient l'œdème cérébral chez le rat avec une infusion d'ammoniaque (Takahashi *et al.*, 1990) et inhibe le gonflement des astrocytes exposés à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque (Norenberg and Bender 1994). Cependant, des résultats plus contrastés ont été mis en évidence. En effet, la méthionine sulfoximine ne prévient pas complètement l'œdème cérébral chez le rat avec une anastomose porto-cave et une infusion d'ammoniaque, et les taux cérébraux de glutamine ne sont pas corrélés avec la survenue de l'œdème cérébral (Blei *et al.*, 1994). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la glutamine joue un rôle important dans les mécanismes physiopathologiques de l'œdème cérébral lors d'IHA mais n'est pas le seul facteur impliqué. En particulier, l'accumulation de glutamine au niveau de l'astrocyte induit un stress oxydatif/nitrosatif et des dysfonctions mitochondriales (Albrecht and Norenberg 2006; Skowronska and Albrecht 2012). De plus, l'inhibition de la voie NF- κ B est associée à une diminution du gonflement cellulaire dans des cultures d'astrocytes exposés à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque et chez le rat traité au thioacétamide (Jayakumar *et al.*, 2011; Sinke *et al.*, 2008), et le gonflement cellulaire est augmenté par un traitement avec des cytokines pro-inflammatoires dans des astrocytes en culture pré-traités à l'ammoniaque (Rama Rao *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent donc que l'inflammation pourrait également jouer un rôle dans le gonflement astrocytaire.

Par ailleurs l'AQP-4, dont l'expression est principalement retrouvée au niveau des astrocytes périvasculaires, est impliquée dans la physiopathologie de l'œdème cérébral de diverses étiologies et son rôle a été suggéré lors d'IHA. En effet, son expression est augmentée et corrélée à la survenue de l'œdème cérébral chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Margulies *et al.*, 1999) et son expression est augmentée et associée au gonflement cellulaire dans des astrocytes en culture exposés à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque (Rama Rao *et al.*, 2003). D'autre part, il est intéressant de constater que le stress oxydatif/nitrosatif augmente l'expression de l'AQP-4, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine (Rama Rao *et al.*, 2003). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle au rôle de l'IL-1 β et de l'ammoniaque dans la régulation de l'expression de l'AQP-4 dans des astrocytes en culture. Nous démontrons que l'expression de l'ARNm codant pour l'AQP-4 est augmentée par traitement à l'IL-1 β mais que l'ammoniaque, seul ou combiné à l'IL-1 β , est sans effet (Article 4, Figure 1). Ces résultats sont concordants avec une étude précédente qui démontre que l'IL-1 β régule positivement l'expression de l'AQP-4, *via* la voie NF- κ B (Ito *et al.*, 2006). D'autre part, nous démontrons que l'exposition à l'IL-1 β ou à l'ammoniaque diminue significativement l'expression de l'ARNm codant pour la GFAP (Article 4, Figure 2), un filament intermédiaire impliqué dans les propriétés viscoélastiques des astrocytes. Ce résultat est conforme à ce qui est observé chez le rat avec une dévascularisation hépatique (Belanger *et al.*, 2002) où l'expression de l'ARNm et de la protéine GFAP sont diminués et corrélés à la progression de l'EH. L'ensemble de ces résultats démontre que l'inflammation et l'ammoniaque jouent un rôle conjoint, *via* des mécanismes de stress oxydatif/nitrosatif notamment, dans la survenue de l'œdème cérébral et dans la physiopathologie de l'EH lors

d'IHA. Comme énoncé dans la section précédente, la poursuite de l'étude des effets du stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA apparaît comme une voie prometteuse dans la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de l'inflammation, périphérique ou cérébrale, et de l'ammoniaque.

CHAPITRE 4 :
CONCLUSIONS

Les résultats de cette thèse démontrent que :

1. L'IHA s'accompagne d'une augmentation rapide des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires qui précède la nécrose massive des hépatocytes observée au stade de coma hépatique chez la souris traitée à l'AOM, ce qui suggère que les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'EH.

2. L'etanercept injecté en périphérie retarde la progression des complications neurologiques et de la pathologie hépatique lors d'IHA chez la souris traitée à l'AOM. S'agissant des mécanismes impliqués, l'etanercept diminue le dommage hépatocellulaire, réduit l'inflammation périphérique et centrale ainsi que le stress oxydatif/nitrosatif hépatique et cérébral associé. Ces résultats démontrent un rôle important du TNF- α dans la physiopathologie de l'EH lors d'IHA d'origine toxique et suggèrent que l'etanercept pourrait constituer une approche thérapeutique dans la prise en charge des patients en attente de transplantation hépatique.

3. L'endotoxémie induite par le LPS à une dose non létale précipite la survenue du coma hépatique lors d'IHA en accélérant et en aggravant la pathologie hépatique. Les réponses pro-inflammatoires systémiques et cérébrales sont augmentées de façon synergique par le LPS lors d'IHA et résultent en une activation accrue de MMP-9 cérébrale qui s'accompagne d'une extravasation d'IgG dans le parenchyme cérébral. Ces résultats démontrent pour la première fois une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE qui contribue à la pathogenèse de l'EH lors d'IHA en conditions infectieuses.

4. L'intégrité de la BHE est maintenue lors d'IHA induite par l'AOM chez la souris. L'expression des jonctions serrées n'est pas modifiée dans ce modèle, et aucune extravasation d'IgG ou d'etanercept n'est observée au stade de coma hépatique.

5. L'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque ou d'IL-1 β résulte en une augmentation de l'expression des ARNm codant pour NOSi et HO-1, et en une augmentation accrue de leur expression lors d'un traitement combiné. Ce résultat est concordant avec des études précédentes et démontre d'une part que l'inflammation induit un stress oxydatif/nitrosatif au niveau des astrocytes, et suggère d'autre part que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle de concert dans les mécanismes impliquant le stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA.

6. L'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'IL- β résulte en une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour l'AQP-4 tandis que celle de l'ARNm codant pour la GFAP est diminuée par un traitement à l'ammoniaque ou à l'IL-1 β . Aucun effet additif n'est observé lors d'un traitement combiné. Ces résultats démontrent que l'ammoniaque et l'IL-1 β exercent également des effets spécifiques qui résultent en la perturbation de l'expression de gènes astrocytaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire.

CHAPITRE 5 :
SOMMAIRE

L'IHA entraîne de nombreuses complications périphériques et centrales. Au niveau systémique, l'IHA s'accompagne d'une réaction inflammatoire qui joue un rôle important à la fois dans la progression et dans l'issue de la pathologie hépatique. En particulier, de nombreuses études démontrent que les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires sont plus élevés chez les patients décédés d'IHA que chez ceux qui ont survécu. Les résultats de cette thèse démontrent que les cytokines pro-inflammatoires circulantes sont augmentées rapidement après l'induction de l'IHA chez la souris traitée à l'AOM et leur apparition précède la nécrose hépatique ce qui suggère que les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans la pathogenèse de l'EH.

D'autre part, l'inhibition du TNF- α périphérique retarde la progression de l'EH et la survenue du coma hépatique en diminuant le dommage hépatique, l'inflammation périphérique et cérébrale ainsi que le stress oxydatif/nitrosatif associé, ce qui conforte le rôle important des cytokines pro-inflammatoires périphériques dans la physiopathologie des complications neurologiques lors d'IHA. Enfin, l'endotoxémie résultant d'une injection non létale de LPS précipite la progression de l'EH et la survenue du coma hépatique lors d'IHA induite chez la souris traitée à l'AOM en augmentant le dommage hépatique. Cette étude révèle une augmentation accrue la réponse pro-inflammatoire systémique et cérébrale par rapport à l'IHA non compliquée par l'endotoxémie, avec une augmentation plus importante de l'activité cérébrale de MMP-9 qui s'accompagne d'une extravasation d'IgG au niveau cérébral, caractéristique d'une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE. Ces résultats suggèrent des mécanismes inflammatoires synergiques entre le LPS et l'IHA tant au niveau périphérique que cérébral qui pourraient expliquer l'aggravation de l'EH observée chez les patients infectés lors d'IHA. Des études complémentaires sont

cependant nécessaires pour confirmer ces informations et mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques impliqués lors d'infection.

D'un point de vue neuropathologique, l'IHA est associée à un œdème cérébral d'origine cytotoxique affectant les astrocytes qui peut entraîner une augmentation de la PIC et conduire au décès par herniation du tronc cérébral. La BHE reste globalement intacte lors d'IHA et cette thèse démontre que l'expression des JS n'est pas modifiée au stade coma lors d'un traitement par l'AOM, ce qui est conforme à ce qui est observé chez les patients atteints d'IHA. D'autre part, l'endotoxémie induit une augmentation majeure de la perméabilité de la BHE avec une extravasation des IgG ce qui suggère que des mécanismes vasogéniques sont également impliqués, en plus des mécanismes cytotoxiques, dans la progression de l'EH en condition infectieuse.

L'ammoniaque joue un rôle majeur dans la survenue de l'œdème cérébral lors d'IHA et de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* démontrent que cette molécule induit des changements d'expression au niveau de l'astrocyte. D'autre part, des évidences suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées dans la physiopathologie de l'œdème cérébral. Cette thèse démontre que l'exposition d'astrocytes en culture à des concentrations physiopathologiques d'ammoniaque ou d'IL-1 β résulte en une augmentation de l'expression des ARNm codant pour NOSi et HO-1, et en une augmentation accrue de leur expression lors d'un traitement combiné, ce qui suggère que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle de concert dans le stress oxydatif/nitrosatif lors d'IHA. D'autre part, l'IL-1 β seule induit une augmentation de l'expression astrocytaire de l'ARNm codant pour l'AQP-4, et l'ammoniaque et l'IL-1 β induisent une diminution de

l'expression de l'ARNm codant pour la GFAP sans effet additif lors d'un traitement combiné. Ces résultats démontrent que l'ammoniaque et l'IL-1 β exercent également des effets spécifiques qui résultent en la perturbation de l'expression de gènes astrocytaires impliqués dans la régulation du volume cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggère d'une part que l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires sont impliqués dans la physiopathologie de l'œdème cérébral et d'autre part qu'ils exercent des effets spécifiques ou conjoints dans la perturbation des fonctions astrocytaires lors d'IHA.

En conclusion, cette thèse a démontré que l'inflammation périphérique et cérébrale joue un rôle de concert avec l'ammoniaque dans la survenue des complications neurologiques lors d'IHA (Figure 5.1). Les cytokines pro-inflammatoires contribuent à la fois à l'augmentation de la perméabilité de la BHE, au stress oxydatif/nitrosatif périphérique et cérébral et à la perturbation des fonctions astrocytaires qui sont des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'EH et de l'œdème cérébral lors d'IHA. Une meilleure compréhension de l'interrelation entre l'ammoniaque et les cytokines pro-inflammatoires, tant du point de vue des mécanismes que de leur succession au cours du temps, pourrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques pour les patients atteints d'IHA en attente de transplantation.

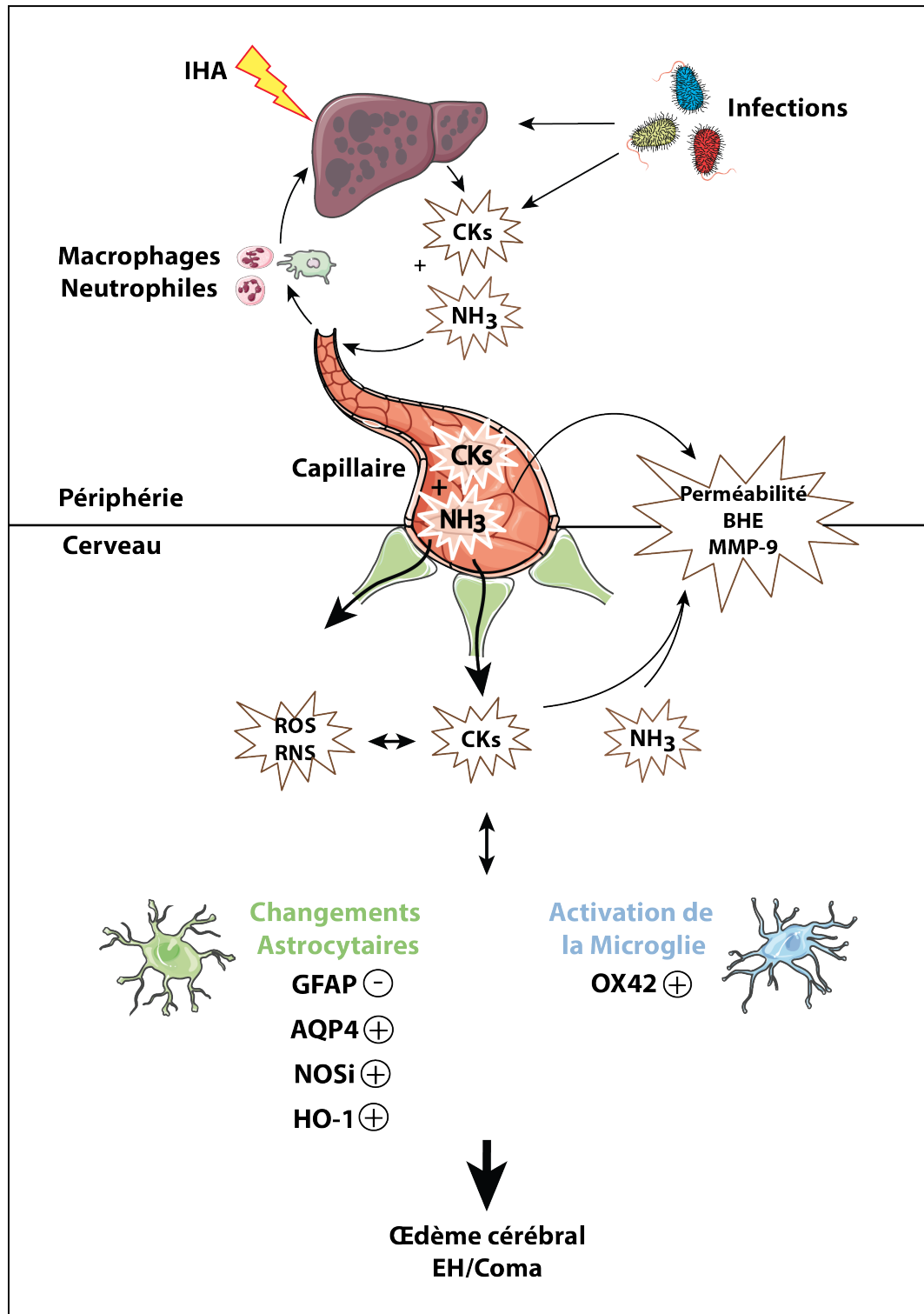


Figure 5.1 : Physiopathologie de l'EH et de l'œdème cérébral lors d'IHA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acharya S. K., Bhatia V., Sreenivas V., Khanal S. and Panda S. K. (2009). "Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled study." *Gastroenterology* **136**(7): 2159-2168.
- Aickin C. C., Deisz R. A. and Lux H. D. (1982). "Ammonium action on post-synaptic inhibition in crayfish neurones: implications for the mechanism of chloride extrusion." *J Physiol* **329**: 319-339.
- Albrecht J. and Dolinska M. (2001). "Glutamine as a pathogenic factor in hepatic encephalopathy." *J Neurosci Res* **65**(1): 1-5.
- Albrecht J. and Norenberg M. D. (2006). "Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity." *Hepatology* **44**(4): 788-794.
- Allred A. (2001). "Etanercept in rheumatoid arthritis." *Expert Opin Pharmacother* **2**(7): 1137-1148.
- Aloisi F., Ambrosini E., Columba-Cabezas S., Magliozzi R. and Serafini B. (2001). "Intracerebral regulation of immune responses." *Ann Med* **33**(8): 510-515.
- Anderson C. M. and Nedergaard M. (2003). "Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation." *Trends Neurosci* **26**(7): 340-344; author reply 344-345.
- Andersson A. K., Ronnback L. and Hansson E. (2005). "Lactate induces tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-1beta release in microglial- and astroglial-enriched primary cultures." *J Neurochem* **93**(5): 1327-1333.
- Ando-Akatsuka Y., Saitou M., Hirase T., Kishi M., Sakakibara A., Itoh M., Yonemura S., Furuse M. and Tsukita S. (1996). "Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues." *J Cell Biol* **133**(1): 43-47.

- Antoniades C. G., Berry P. A., Davies E. T., Hussain M., Bernal W., Vergani D. and Wendon J. (2006). "Reduced monocyte HLA-DR expression: a novel biomarker of disease severity and outcome in acetaminophen-induced acute liver failure." *Hepatology* **44**(1): 34-43.
- Antoniades C. G., Berry P. A., Wendon J. A. and Vergani D. (2008). "The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure." *J Hepatol* **49**(5): 845-861.
- Balda M. S., Whitney J. A., Flores C., Gonzalez S., Cerejido M. and Matter K. (1996). "Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein." *J Cell Biol* **134**(4): 1031-1049.
- Bamforth S. D., Kniesel U., Wolburg H., Engelhardt B. and Risau W. (1999). "A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function." *J Cell Sci* **112** (Pt **12**): 1879-1888.
- Banks W. A., Dohgu S., Lynch J. L., Fleegal-DeMotta M. A., Erickson M. A., Nakaoke R. and Vo T. Q. (2008). "Nitric oxide isoenzymes regulate lipopolysaccharide-enhanced insulin transport across the blood-brain barrier." *Endocrinology* **149**(4): 1514-1523.
- Barba I., Chatauret N., Garcia-Dorado D. and Cordoba J. (2008). "A 1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic approach for grading hepatic encephalopathy and monitoring the effects of therapeutic hypothermia in rats." *Liver Int* **28**(8): 1141-1148.
- Belanger M., Desjardins P., Chatauret N. and Butterworth R. F. (2002). "Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia." *Neurochem Int* **41**(2-3): 155-160.

- Belanger M., Desjardins P., Chatauret N., Rose C. and Butterworth R. F. (2005). "Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure." *J Hepatol* **42**(5): 694-699.
- Belanger M., Cote J. and Butterworth R. F. (2006). "Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure." *Neurochem Int* **48**(6-7): 434-440.
- Bemour C., Vaquero J., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2010a). "N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms." *Metab Brain Dis* **25**(2): 241-249.
- Bemour C., Qu H., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2010b). "IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure." *Neurochem Int* **56**(2): 213-215.
- Bemour C., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2010c). "Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse." *Metab Brain Dis* **25**(1): 23-29.
- Benveniste E. N. (1992). "Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action." *Am J Physiol* **263**(1 Pt 1): C1-16.
- Bernal W., Donaldson P., Underhill J., Wendon J. and Williams R. (1998). "Tumor necrosis factor genomic polymorphism and outcome of acetaminophen (paracetamol)-induced acute liver failure." *J Hepatol* **29**(1): 53-59.
- Bernal W., Hall C., Karvellas C. J., Auzinger G., Sizer E. and Wendon J. (2007). "Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure." *Hepatology* **46**(6): 1844-1852.
- Bernal W., Auzinger G., Dhawan A. and Wendon J. (2010). "Acute liver failure." *Lancet* **376**(9736): 190-201.

- Bihari D., Gimson A. E., Waterson M. and Williams R. (1985). "Tissue hypoxia during fulminant hepatic failure." *Crit Care Med* **13**(12): 1034-1039.
- Blazka M. E., Wilmer J. L., Holladay S. D., Wilson R. E. and Luster M. I. (1995). "Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity." *Toxicol Appl Pharmacol* **133**(1): 43-52.
- Blei A. T., Olafsson S., Therrien G. and Butterworth R. F. (1994). "Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis." *Hepatology* **19**(6): 1437-1444.
- Boess F., Bopst M., Althaus R., Polsky S., Cohen S. D., Eugster H. P. and Boelsterli U. A. (1998). "Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha gene knockout mice." *Hepatology* **27**(4): 1021-1029.
- Boetticher N. C., Peine C. J., Kwo P., Abrams G. A., Patel T., Aqel B., Boardman L., Gores G. J., Harmsen W. S., McClain C. J., Kamath P. S. and Shah V. H. (2008). "A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of etanercept in the treatment of alcoholic hepatitis." *Gastroenterology* **135**(6): 1953-1960.
- Bone R. C. (1996). "Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)." *Ann Intern Med* **125**(8): 680-687.
- Boulton R., Woodman A., Calnan D., Selden C., Tam F. and Hodgson H. (1997). "Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation." *Hepatology* **26**(1): 49-58.
- Bromberg P. A., Robin E. D. and Forkner C. E., Jr. (1960). "The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH₄ plus minus NH₃ system." *J Clin Invest* **39**: 332-341.

- Brun-Buisson C. (2000). "The epidemiology of the systemic inflammatory response." *Intensive Care Med* **26 Suppl 1**: S64-74.
- Butterworth R. F. (2002). "Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia." *Metab Brain Dis* **17**(4): 221-227.
- Butterworth R. F. (2003). "Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices." *Liver Int* **23 Suppl 3**: 5-9.
- Butterworth R. F., Norenberg M. D., Felipe V., Ferenci P., Albrecht J. and Blei A. T. (2009). "Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines." *Liver Int* **29**(6): 783-788.
- Butterworth R. F. (2011). "Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder?" *Hepatology* **53**(4): 1372-1376.
- Camargo C. A., Jr., Madden J. F., Gao W., Selvan R. S. and Clavien P. A. (1997). "Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent." *Hepatology* **26**(6): 1513-1520.
- Campsen J., Blei A. T., Emond J. C., Everhart J. E., Freise C. E., Lok A. S., Saab S., Wisniewski K. A. and Trotter J. F. (2008). "Outcomes of living donor liver transplantation for acute liver failure: the adult-to-adult living donor liver transplantation cohort study." *Liver Transpl* **14**(9): 1273-1280.
- Capuron L. and Miller A. H. (2011). "Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications." *Pharmacol Ther* **130**(2): 226-238.
- Cauli O., Lopez-Larrubia P., Rodrigo R., Agusti A., Boix J., Nieto-Charques L., Cerdan S. and Felipe V. (2011). "Brain region-selective mechanisms contribute to the progression of cerebral alterations in acute liver failure in rats." *Gastroenterology* **140**(2): 638-645.

- Chan H., Hazell A. S., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2000). "Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes." *Neurochem Int* **37**(2-3): 243-248.
- Chan H., Butterworth R. F. and Hazell A. S. (2004). "Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels." *Neurosci Lett* **366**(3): 231-234.
- Chatauret N., Rose C., Therrien G. and Butterworth R. F. (2001). "Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure." *Metab Brain Dis* **16**(1-2): 95-102.
- Chatauret N., Zwingmann C., Rose C., Leibfritz D. and Butterworth R. F. (2003). "Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study." *Gastroenterology* **125**(3): 815-824.
- Chavarria L., Oria M., Romero-Gimenez J., Alonso J., Lope-Piedrafita S. and Cordoba J. (2010). "Diffusion tensor imaging supports the cytotoxic origin of brain edema in a rat model of acute liver failure." *Gastroenterology* **138**(4): 1566-1573.
- Chen F., Ohashi N., Li W., Eckman C. and Nguyen J. H. (2009). "Disruptions of occludin and claudin-5 in brain endothelial cells in vitro and in brains of mice with acute liver failure." *Hepatology* **50**(6): 1914-1923.
- Chenard-Neu M. P., Boudjema K., Bernuau J., Degott C., Belghiti J., Cherqui D., Costes V., Domergue J., Durand F., Erhard J., De Hemptinne B., Gubernatis G., Hadengue A., Kemnitz J., McCarthy M., Maschek H., Mentha G., Oldhafer K., Portmann B., Praet M., Ringers J., Rogiers X., Rubbia L., Schalm S., Bellocq J. P. and et al. (1996). "Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure--a multicenter European study." *Hepatology* **23**(5): 1119-1127.

- Chu C. J., Chen C. T., Wang S. S., Lee F. Y., Chang F. Y., Lin H. C., Wu S. L., Lu R. H., Chan C. C., Huang H. C. and Lee S. D. (2001). "Hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure: role of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* **64**(6): 321-330.
- Chung I. Y. and Benveniste E. N. (1990). "Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta." *J Immunol* **144**(8): 2999-3007.
- Clawson C. C., Hartmann J. F. and Vernier R. L. (1966). "Electron microscopy of the effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier." *J Comp Neurol* **127**(2): 183-198.
- Clemmesen J. O., Larsen F. S., Kondrup J., Hansen B. A. and Ott P. (1999). "Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration." *Hepatology* **29**(3): 648-653.
- Clemmesen J. O., Hoy C. E., Kondrup J. and Ott P. (2000). "Splanchnic metabolism of fuel substrates in acute liver failure." *J Hepatol* **33**(6): 941-948.
- Cooper A. J., McDonald J. M., Gelbard A. S., Gledhill R. F. and Duffy T. E. (1979). "The metabolic fate of ¹³N-labeled ammonia in rat brain." *J Biol Chem* **254**(12): 4982-4992.
- Cooper A. J. and Plum F. (1987). "Biochemistry and physiology of brain ammonia." *Physiol Rev* **67**(2): 440-519.
- Cordoba J., Alonso J., Rovira A., Jacas C., Sanpedro F., Castells L., Vargas V., Margarit C., Kulisevsky J., Esteban R. and Guardia J. (2001). "The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H-magnetic resonance abnormalities after liver transplantation." *J Hepatol* **35**(5): 598-604.

- Cressman D. E., Greenbaum L. E., DeAngelis R. A., Ciliberto G., Furth E. E., Poli V. and Taub R. (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." *Science* **274**(5291): 1379-1383.
- Cunningham L. A., Wetzel M. and Rosenberg G. A. (2005). "Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia." *Glia* **50**(4): 329-339.
- D'Mello C., Le T. and Swain M. G. (2009). "Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation." *J Neurosci* **29**(7): 2089-2102.
- D'Mello C. and Swain M. G. (2011). "Liver-brain inflammation axis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**(5): G749-761.
- Dejong C. H., Deutz N. E. and Soeters P. B. (1993). "Renal ammonia and glutamine metabolism during liver insufficiency-induced hyperammonemia in the rat." *J Clin Invest* **92**(6): 2834-2840.
- Desjardins P., Rao K. V., Michalak A., Rose C. and Butterworth R. F. (1999). "Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle." *Metab Brain Dis* **14**(4): 273-280.
- Deutz N. E., Chamuleau R. A., de Graaf A. A., Bovee W. M. and de Beer R. (1988). "In vivo ^{31}P NMR spectroscopy of the rat cerebral cortex during acute hepatic encephalopathy." *NMR Biomed* **1**(2): 101-106.
- Dringen R., Gutterer J. M. and Hirrlinger J. (2000). "Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species." *Eur J Biochem* **267**(16): 4912-4916.

- Duchini A., Govindarajan S., Santucci M., Zampi G. and Hofman F. M. (1996). "Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells." *J Investig Med* **44**(8): 474-482.
- Eefsen M., Jelnes P., Schmidt L. E., Vainer B., Bisgaard H. C. and Larsen F. S. (2010). "Brain expression of the water channels aquaporin-1 and -4 in mice with acute liver injury, hyperammonemia and brain edema." *Metab Brain Dis* **25**(3): 315-323.
- Farmer D. G., Anselmo D. M., Ghobrial R. M., Yersiz H., McDiarmid S. V., Cao C., Weaver M., Figueroa J., Khan K., Vargas J., Saab S., Han S., Durazo F., Goldstein L., Holt C. and Busuttil R. W. (2003). "Liver transplantation for fulminant hepatic failure: experience with more than 200 patients over a 17-year period." *Ann Surg* **237**(5): 666-675; discussion 675-666.
- Felipo V. and Butterworth R. F. (2002). "Neurobiology of ammonia." *Prog Neurobiol* **67**(4): 259-279.
- Ferenci P., Lockwood A., Mullen K., Tarter R., Weissenborn K. and Blei A. T. (2002). "Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998." *Hepatology* **35**(3): 716-721.
- Fischer S., Wobben M., Marti H. H., Renz D. and Schaper W. (2002). "Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1." *Microvasc Res* **63**(1): 70-80.
- Galanos C., Freudenberg M. A. and Reutter W. (1979). "Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5939-5943.
- Ganda O. P. and Ruderman N. B. (1976). "Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency." *Metabolism* **25**(4): 427-435.

- Garcia-Ruiz C. and Fernandez-Checa J. C. (2007). "Redox regulation of hepatocyte apoptosis." *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**: S38-42.
- Gee J. R. and Keller J. N. (2005). "Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E." *Int J Biochem Cell Biol* **37(6)**: 1145-1150.
- Gill R. Q. and Sterling R. K. (2001). "Acute liver failure." *J Clin Gastroenterol* **33(3)**: 191-198.
- Gorg B., Foster N., Reinehr R., Bidmon H. J., Hongen A., Haussinger D. and Schliess F. (2003). "Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes." *Hepatology* **37(2)**: 334-342.
- Gorg B., Bidmon H. J., Keitel V., Foster N., Goerlich R., Schliess F. and Haussinger D. (2006). "Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes." *Arch Biochem Biophys* **449(1-2)**: 104-114.
- Gorg B., Qvartrskhava N., Voss P., Grune T., Haussinger D. and Schliess F. (2007). "Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration." *FEBS Lett* **581(1)**: 84-90.
- Gottschall P. E. and Deb S. (1996). "Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons." *Neuroimmunomodulation* **3(2-3)**: 69-75.
- Graeber M. B. and Streit W. J. (2010). "Microglia: biology and pathology." *Acta Neuropathol* **119(1)**: 89-105.
- Griffin W. S., Sheng J. G., Royston M. C., Gentleman S. M., McKenzie J. E., Graham D. I., Roberts G. W. and Mrazek R. E. (1998). "Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression." *Brain Pathol* **8(1)**: 65-72.

- Guix F. X., Uribesalgo I., Coma M. and Munoz F. J. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Prog Neurobiol* **76**(2): 126-152.
- Gujral J. S., Knight T. R., Farhood A., Bajt M. L. and Jaeschke H. (2002). "Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis?" *Toxicol Sci* **67**(2): 322-328.
- Guo L. M., Liu J. Y., Xu D. Z., Li B. S., Han H., Wang L. H., Zhang W. Y., Lu L. H., Guo X., Sun F. X., Zhang H. Y., Liu X. D., Zhang J. P., Yao Y., He Z. P. and Wang M. M. (2003). "Application of Molecular Adsorbents Recirculating System to remove NO and cytokines in severe liver failure patients with multiple organ dysfunction syndrome." *Liver Int* **23 Suppl 3**: 16-20.
- Hahn M., Massen O., Nencki M. and Pavlov I. (1893). "Die Eck'sche fistel zwischen der unteren hohlvene und der pfortader und ihre folgen fur den organismus." *Arch. Exp. Pathol. Pharm.* **32**: 161-210.
- Hallenbeck J., Del Zoppo G., Jacobs T., Hakim A., Goldman S., Utz U. and Hasan A. (2006). "Immunomodulation strategies for preventing vascular disease of the brain and heart: workshop summary." *Stroke* **37**(12): 3035-3042.
- Hamada E., Nishida T., Uchiyama Y., Nakamura J., Isahara K., Kazuo H., Huang T. P., Momoi T., Ito T. and Matsuda H. (1999). "Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin." *J Hepatol* **30**(5): 807-818.
- Hamada T., Fondavila C., Busuttill R. W. and Coito A. J. (2008). "Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury." *Hepatology* **47**(1): 186-198.
- Handa O., Stephen J. and Cepinskas G. (2008). "Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(4): H1712-1719.

- Haussinger D., Sies H. and Gerok W. (1985). "Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle." *J Hepatol* **1**(1): 3-14.
- Haydon P. G. and Carmignoto G. (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." *Physiol Rev* **86**(3): 1009-1031.
- Heard K. J. (2008). "Acetylcysteine for acetaminophen poisoning." *N Engl J Med* **359**(3): 285-292.
- Heo J. H., Han S. W. and Lee S. K. (2005). "Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke." *Free Radic Biol Med* **39**(1): 51-70.
- Holmin T., Agardh C. D., Alinder G., Herlin P. and Hultberg B. (1983). "The influence of total hepatectomy on cerebral energy state, ammonia-related amino acids of the brain and plasma amino acids in the rat." *Eur J Clin Invest* **13**(3): 215-220.
- Hoofnagle J. H., Carithers R. L., Jr., Shapiro C. and Ascher N. (1995). "Fulminant hepatic failure: summary of a workshop." *Hepatology* **21**(1): 240-252.
- Ito H., Yamamoto N., Arima H., Hirate H., Morishima T., Umenishi F., Tada T., Asai K., Katsuya H. and Sobue K. (2006). "Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes." *J Neurochem* **99**(1): 107-118.
- Iwai H., Nagaki M., Naito T., Ishiki Y., Murakami N., Sugihara J., Muto Y. and Moriwaki H. (1998). "Removal of endotoxin and cytokines by plasma exchange in patients with acute hepatic failure." *Crit Care Med* **26**(5): 873-876.
- Izumi S., Hughes R. D., Langley P. G., Pernambuco J. R. and Williams R. (1994). "Extent of the acute phase response in fulminant hepatic failure." *Gut* **35**(7): 982-986.

- Jaeschke H., McGill M. R. and Ramachandran A. (2012). "Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity." *Drug Metab Rev* **44**(1): 88-106.
- Jalan R., SW O. Damink, Deutz N. E., Lee A. and Hayes P. C. (1999). "Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure." *Lancet* **354**(9185): 1164-1168.
- Jalan R., Olde Damink S. W., Deutz N. E., Hayes P. C. and Lee A. (2001). "Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia." *Hepatology* **34**(1): 50-54.
- Jalan R., Pollok A., Shah S. H., Madhavan K. and Simpson K. J. (2002). "Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure." *J Hepatol* **37**(4): 536-538.
- Jalan R. (2003). "Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management." *Semin Liver Dis* **23**(3): 271-282.
- Jalan R., Olde Damink S. W., Deutz N. E., Hayes P. C. and Lee A. (2004). "Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension." *Gastroenterology* **127**(5): 1338-1346.
- Jalan R., Wright G., Davies N. A. and Hodges S. J. (2007). "L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy." *Med Hypotheses* **69**(5): 1064-1069.
- Jalan R. and Lee W. M. (2009). "Treatment of hyperammonemia in liver failure: a tale of two enzymes." *Gastroenterology* **136**(7): 2048-2051.

- Jayakumar A. R., Bethea J. R., Tong X. Y., Gomez J. and Norenberg M. D. (2011). "NF-kappaB in the mechanism of brain edema in acute liver failure: studies in transgenic mice." *Neurobiol Dis* **41**(2): 498-507.
- Jiang W., Qu H., Desjardins P., Chatauret N., Belanger M. and Butterworth R. F. (2006). "Unequivocal evidence for cytokine accumulation in brain in experimental acute liver failure." *Hepatology* **44**(S1): 366A (Abstract).
- Jiang W., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2009a). "Direct evidence for central proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia." *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(5): 944-952.
- Jiang W., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2009b). "Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats." *Neurochem Int* **55**(7): 601-605.
- Jiang W., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2009c). "Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline." *J Neurochem* **109**(2): 485-493.
- Jiang W., Desjardins P. and Butterworth R. F. (2009d). "Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure." *Neurochem Int* **55**(1-3): 124-128.
- Kantola T., Koivusalo A. M., Hockerstedt K. and Isoniemi H. (2008). "The effect of molecular adsorbent recirculating system treatment on survival, native liver recovery, and need for liver transplantation in acute liver failure patients." *Transpl Int* **21**(9): 857-866.
- Kasravi F. B., Wang L., Wang X. D., Molin G., Bengmark S. and Jeppsson B. (1996). "Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine." *Hepatology* **23**(1): 97-103.

- Kato M., Hughes R. D., Keays R. T. and Williams R. (1992). "Electron microscopic study of brain capillaries in cerebral edema from fulminant hepatic failure." *Hepatology* **15**(6): 1060-1066.
- Kelly T., Kafitz K. W., Roderigo C. and Rose C. R. (2009). "Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity." *Glia* **57**(9): 921-934.
- Kendall B. E., Kingsley D. P., Leonard J. V., Lingam S. and Oberholzer V. G. (1983). "Neurological features and computed tomography of the brain in children with ornithine carbamoyl transferase deficiency." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **46**(1): 28-34.
- Kim J. H., Kim J. H., Park J. A., Lee S. W., Kim W. J., Yu Y. S. and Kim K. W. (2006). "Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface." *J Biochem Mol Biol* **39**(4): 339-345.
- Kim Y., Park G., Lee M. and Lee J. H. (2009). "Impairment of driving ability and neuropsychological function in patients with MHE disease." *Cyberpsychol Behav* **12**(4): 433-436.
- Klatzo I. (1967). "Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema." *J Neuropathol Exp Neurol* **26**(1): 1-14.
- Klatzo I. (1994). "Evolution of brain edema concepts." *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **60**: 3-6.
- Knecht K., Michalak A., Rose C., Rothstein J. D. and Butterworth R. F. (1997). "Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure." *Neurosci Lett* **229**(3): 201-203.

- Kosenko E., Kaminsky Y., Kaminsky A., Valencia M., Lee L., Hermenegildo C. and Felipo V. (1997). "Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats." *Free Radic Res* **27**(6): 637-644.
- Kosenko E., Venediktova N., Kaminsky Y., Montoliu C. and Felipo V. (2003). "Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo." *Brain Res* **981**(1-2): 193-200.
- Kovalovich K., Li W., DeAngelis R., Greenbaum L. E., Ciliberto G. and Taub R. (2001). "Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL." *J Biol Chem* **276**(28): 26605-26613.
- Koziel M. J. (1999). "Cytokines in viral hepatitis." *Semin Liver Dis* **19**(2): 157-169.
- Kuma S., Inaba M., Ogata H., Inaba K., Okumura T., Saito K., Yamamoto M. and Ikehara S. (1990). "Effect of human recombinant interleukin-6 on the proliferation of mouse hepatocytes in the primary culture." *Immunobiology* **180**(2-3): 235-242.
- Lai J. C. and Cooper A. J. (1986). "Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors." *J Neurochem* **47**(5): 1376-1386.
- Langmann T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." *J Leukoc Biol* **81**(6): 1345-1351.
- Laqueur G. L., Mickelsen O., Whiting M. G. and Kurland L. T. (1963). "Carcinogenic Properties of Nuts from *Cycas Circinalis* L. Indigenous to Guam." *J Natl Cancer Inst* **31**: 919-951.

- Laroux F. S., Pavlick K. P., Hines I. N., Kawachi S., Harada H., Bharwani S., Hoffman J. M. and Grisham M. B. (2001). "Role of nitric oxide in inflammation." *Acta Physiol Scand* **173**(1): 113-118.
- Larsen F. S. and Wendon J. (2008). "Prevention and management of brain edema in patients with acute liver failure." *Liver Transpl* **14 Suppl 2**: S90-96.
- Laskin D. L., Gardner C. R., Price V. F. and Jollow D. J. (1995). "Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen." *Hepatology* **21**(4): 1045-1050.
- Lee W. M., Squires R. H., Jr., Nyberg S. L., Doo E. and Hoofnagle J. H. (2008). "Acute liver failure: Summary of a workshop." *Hepatology* **47**(4): 1401-1415.
- Leifeld L., Trautwein C., Dumoulin F. L., Manns M. P., Sauerbruch T. and Spengler U. (1999). "Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure." *Am J Pathol* **154**(6): 1711-1720.
- Leithead J. A., Ferguson J. W., Bates C. M., Davidson J. S., Lee A., Bathgate A. J., Hayes P. C. and Simpson K. J. (2009). "The systemic inflammatory response syndrome is predictive of renal dysfunction in patients with non-paracetamol-induced acute liver failure." *Gut* **58**(3): 443-449.
- Leppert D., Lindberg R. L., Kappos L. and Leib S. L. (2001). "Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis." *Brain Res Brain Res Rev* **36**(2-3): 249-257.
- Lockwood A. H., McDonald J. M., Reiman R. E., Gelbard A. S., Laughlin J. S., Duffy T. E. and Plum F. (1979). "The dynamics of ammonia metabolism in man. Effects of liver disease and hyperammonemia." *J Clin Invest* **63**(3): 449-460.

- Lockwood A. H., Yap E. W. and Wong W. H. (1991). "Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy." *J Cereb Blood Flow Metab* **11**(2): 337-341.
- Lv S., Song H. L., Zhou Y., Li L. X., Cui W., Wang W. and Liu P. (2010). "Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure." *Liver Int* **30**(8): 1198-1210.
- Lynch M. A. (2009). "The multifaceted profile of activated microglia." *Mol Neurobiol* **40**(2): 139-156.
- Mans A. M., DeJoseph M. R. and Hawkins R. A. (1994). "Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure." *J Neurochem* **63**(5): 1829-1838.
- Margulies, Thompson RC. and Demetriou A. A. (1999). "Aquaporin-4 water channel is upregulated in the brain in fulminant hepatic failure. ." *Hepatology* **30**: 395A (Abstract).
- Marks-Konczalik J., Chu S. C. and Moss J. (1998). "Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites." *J Biol Chem* **273**(35): 22201-22208.
- Martin C., Saux P., Mege J. L., Perrin G., Papazian L. and Gouin F. (1994). "Prognostic values of serum cytokines in septic shock." *Intensive Care Med* **20**(4): 272-277.
- Martin C., Boisson C., Haccoun M., Thomachot L. and Mege J. L. (1997). "Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma." *Crit Care Med* **25**(11): 1813-1819.
- Matkowskyj K. A., Marrero J. A., Carroll R. E., Danilkovich A. V., Green R. M. and Benya R. V. (1999). "Azoxy methane-induced fulminant hepatic failure in C57BL/6J mice: characterization of a new animal model." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): G455-462.

- McCoy M. K. and Tansey M. G. (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." *J Neuroinflammation* **5**: 45.
- Means T. K., Golenbock D. T. and Fenton M. J. (2000). "The biology of Toll-like receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(3): 219-232.
- Menon K. V., Stadheim L., Kamath P. S., Wiesner R. H., Gores G. J., Peine C. J. and Shah V. (2004). "A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis." *Am J Gastroenterol* **99**(2): 255-260.
- Michalak A., Rose C., Butterworth J. and Butterworth R. F. (1996). "Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure." *Hepatology* **24**(4): 908-913.
- Mohammadi M. T., Shid Moosavi S. M. and Dehghani G. A. (2011). "Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats." *Iran Biomed J* **15**(1-2): 22-30.
- Mohler K. M., Torrance D. S., Smith C. A., Goodwin R. G., Stremmer K. E., Fung V. P., Madani H. and Widmer M. B. (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." *J Immunol* **151**(3): 1548-1561.
- Moser H. (1987). "Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron." *Can J Physiol Pharmacol* **65**(2): 141-145.
- Mumtaz K., Azam Z., Hamid S., Abid S., Memon S., Ali Shah H. and Jafri W. (2009). "Role of N-acetylcysteine in adults with non-acetaminophen-induced acute liver failure in a center without the facility of liver transplantation." *Hepatol Int* **3**(4): 563-570.

- Mun-Bryce S. and Rosenberg G. A. (1998). "Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation." *Am J Physiol* **274**(5 Pt 2): R1203-1211.
- Munoz S. J. (1993). "Difficult management problems in fulminant hepatic failure." *Semin Liver Dis* **13**(4): 395-413.
- Munoz S. J. (2008). "Hepatic encephalopathy." *Med Clin North Am* **92**(4): 795-812, viii.
- Murphy N., Auzinger G., Bernel W. and Wendon J. (2004). "The effect of hypertonic sodium chloride on intracranial pressure in patients with acute liver failure." *Hepatology* **39**(2): 464-470.
- Murthy C. R., Rama Rao K. V., Bai G. and Norenberg M. D. (2001). "Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes." *J Neurosci Res* **66**(2): 282-288.
- Nagai H., Matsumaru K., Feng G. and Kaplowitz N. (2002). "Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes." *Hepatology* **36**(1): 55-64.
- Nagaki M., Iwai H., Naiki T., Ohnishi H., Muto Y. and Moriwaki H. (2000). "High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis." *J Infect Dis* **182**(4): 1103-1108.
- Napoli I. and Neumann H. (2009). "Microglial clearance function in health and disease." *Neuroscience* **158**(3): 1030-1038.
- Nencki M. and Zaleski J. (1895). "Ueber die Bestimmung des Ammoniaks in Thierischen Flussigkeiten und Geweben." *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **36**: 385-396.
- Nguyen J. H., Yamamoto S., Steers J., Sevlever D., Lin W., Shimojima N., Castanedes-Casey M., Genco P., Golde T., Richelson E., Dickson D., McKinney M. and Eckman C.

- B. (2006). "Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice." *J Hepatol* **44**(6): 1105-1114.
- Nielsen S., Nagelhus E. A., Amiry-Moghaddam M., Bourque C., Agre P. and Ottersen O. P. (1997). "Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain." *J Neurosci* **17**(1): 171-180.
- Norenberg M. D. and Martinez-Hernandez A. (1979). "Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain." *Brain Res* **161**(2): 303-310.
- Norenberg M. D. (1987). "The role of astrocytes in hepatic encephalopathy." *Neurochem Pathol* **6**(1-2): 13-33.
- Norenberg M. D., Baker L., Norenberg L. O., Blicharska J., Bruce-Gregorios J. H. and Neary J. T. (1991). "Ammonia-induced astrocyte swelling in primary culture." *Neurochem Res* **16**(7): 833-836.
- Norenberg M. D. and Bender A. S. (1994). "Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines." *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **60**: 24-27.
- Norenberg M. D. (1998). "Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy." *Metab Brain Dis* **13**(4): 319-335.
- Nyberg S. L., Cerra F. B. and Gruetter R. (1998). "Brain lactate by magnetic resonance spectroscopy during fulminant hepatic failure in the dog." *Liver Transpl Surg* **4**(2): 158-165.
- Nystrom P. O. (1998). "The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology." *J Antimicrob Chemother* **41 Suppl A**: 1-7.

- O'Connor J. E. and Costell M. (1990). "New roles of carnitine metabolism in ammonia cytotoxicity." *Adv Exp Med Biol* **272**: 183-195.
- O'Grady J. G., Schalm S. W. and Williams R. (1993). "Acute liver failure: redefining the syndromes." *Lancet* **342**(8866): 273-275.
- O'Grady J. G. (2005). "Acute liver failure." *Postgrad Med J* **81**(953): 148-154.
- Odeh M. (2007). "Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory." *Eur J Clin Invest* **37**(4): 291-304.
- Ohira H., Miyata M., Kuroda M., Takagi T., Tojo J., Ochiai H., Kokubun M., Nishimaki T., Kasukawa R. and Obara K. (1996). "Interleukin-6 induces proliferation of rat hepatocytes in vivo." *J Hepatol* **25**(6): 941-947.
- Olde Damink S. W., Deutz N. E., Dejong C. H., Soeters P. B. and Jalan R. (2002). "Interorgan ammonia metabolism in liver failure." *Neurochem Int* **41**(2-3): 177-188.
- Olde Damink S. W., Jalan R. and Dejong C. H. (2009). "Interorgan ammonia trafficking in liver disease." *Metab Brain Dis* **24**(1): 169-181.
- Olle E. W., Ren X., McClintock S. D., Warner R. L., Deogracias M. P., Johnson K. J. and Colletti L. M. (2006). "Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice." *Hepatology* **44**(3): 540-549.
- Ott P., Clemmesen O. and Larsen F. S. (2005). "Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis." *Neurochem Int* **47**(1-2): 13-18.
- Ovanesov M. V., Ayhan Y., Wolbert C., Moldovan K., Sauder C. and Pletnikov M. V. (2008). "Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection." *J Neuroinflammation* **5**: 50.

- Palenzuela L., Mas A., Montaner J. and Cordoba J. (2010). "Matrix metalloproteinase-9 in fulminant hepatic failure." *Hepatology* **51**(4): 1475-1476; author reply 1476.
- Papadopoulos M. C., Davies D. C., Moss R. F., Tighe D. and Bennett E. D. (2000). "Pathophysiology of septic encephalopathy: a review." *Crit Care Med* **28**(8): 3019-3024.
- Papadopoulos M. C. and Verkman A. S. (2007). "Aquaporin-4 and brain edema." *Pediatr Nephrol* **22**(6): 778-784.
- Pastor C. M. and Billiar T. R. (1995). "Regulation and functions of nitric oxide in the liver in sepsis and inflammation." *New Horiz* **3**(1): 65-72.
- Peeling J., Shoemaker L., Gauthier T., Benarroch A., Sutherland G. R. and Minuk G. Y. (1993). "Cerebral metabolic and histological effects of thioacetamide-induced liver failure." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1): G572-578.
- Persidsky Y., Ramirez S. H., Haorah J. and Kanmogne G. D. (2006). "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions." *J Neuroimmune Pharmacol* **1**(3): 223-236.
- Petty M. A. and Lo E. H. (2002). "Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation." *Prog Neurobiol* **68**(5): 311-323.
- Pugliese F., Ruberto F., Perrella S. M., Cappannoli A., Bruno K., Martelli S., Celli P., Summonti D., D'Alio A., Tosi A., Novelli G., Morabito V., Poli L., Rossi M., Berloco P. B. and Pietropaoli P. (2007). "Modifications of intracranial pressure after molecular adsorbent recirculating system treatment in patients with acute liver failure: case reports." *Transplant Proc* **39**(6): 2042-2044.
- Rama Rao K. V., Chen M., Simard J. M. and Norenberg M. D. (2003). "Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes." *Neuroreport* **14**(18): 2379-2382.

- Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Tong X., Alvarez V. M. and Norenberg M. D. (2010). "Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes." *J Neuroinflammation* **7**: 66.
- Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Tong X., Curtis K. M. and Norenberg M. D. (2010). "Brain aquaporin-4 in experimental acute liver failure." *J Neuropathol Exp Neurol* **69**(9): 869-879.
- Rama Rao K. V. and Norenberg M. D. (2012). "Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy." *Neurochem Int* **60**(7): 697-706.
- Rangroo Thrane V., Thrane A. S., Chanag J., Alleluia V., Nagelhus E. A. and Nedergaard M. (2012). "Real-time analysis of microglial activation and motility in hepatic and hyperammonemic encephalopathy." *Neuroscience* **220**: 247-255.
- Ranjan P., Mishra A. M., Kale R., Saraswat V. A. and Gupta R. K. (2005). "Cytotoxic edema is responsible for raised intracranial pressure in fulminant hepatic failure: in vivo demonstration using diffusion-weighted MRI in human subjects." *Metab Brain Dis* **20**(3): 181-192.
- Rao K. V., Brahmbhatt M. and Norenberg M. D. (2012). "Microglia contribute to ammonia-induced astrocyte swelling in culture." *Metab Brain Dis*.
- Raschke R. A., Curry S. C., Rempe S., Gerkin R., Little E., Manch R., Wong M., Ramos A. and Leibowitz A. I. (2008). "Results of a protocol for the management of patients with fulminant liver failure." *Crit Care Med* **36**(8): 2244-2248.
- Record C. O., Buxton B., Chase R. A., Curzon G., Murray-Lyon I. M. and Williams R. (1976). "Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy." *Eur J Clin Invest* **6**(5): 387-394.

- Ringe B., Lubbe N., Kuse E., Frei U. and Pichlmayr R. (1993). "Total hepatectomy and liver transplantation as two-stage procedure." *Ann Surg* **218**(1): 3-9.
- Rodrigo R., Cauli O., Gomez-Pinedo U., Agusti A., Hernandez-Rabaza V., Garcia-Verdugo J. M. and Felipo V. (2010). "Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy." *Gastroenterology* **139**(2): 675-684.
- Rolando N., Harvey F., Brahm J., Philpott-Howard J., Alexander G., Gimson A., Casewell M., Fagan E. and Williams R. (1990). "Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: an analysis of fifty patients." *Hepatology* **11**(1): 49-53.
- Rolando N., Gimson A., Wade J., Philpott-Howard J., Casewell M. and Williams R. (1993). "Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure." *Hepatology* **17**(2): 196-201.
- Rolando N., Ellis A. J., de Groote D., Wendon J. and Williams R. (1995). "Correlation of serial cytokines levels with progression to coma (Grade IV) in patients with acute liver failure (ALF)." *Hepatology* **22**: 366A (Abstract).
- Rolando N., Wade J. J., Stangou A., Gimson A. E., Wendon J., Philpott-Howard J., Casewell M. W. and Williams R. (1996). "Prospective study comparing the efficacy of prophylactic parenteral antimicrobials, with or without enteral decontamination, in patients with acute liver failure." *Liver Transpl Surg* **2**(1): 8-13.
- Rolando N., Wade J., Davalos M., Wendon J., Philpott-Howard J. and Williams R. (2000). "The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure." *Hepatology* **32**(4 Pt 1): 734-739.
- Rose C., Michalak A., Rao K. V., Quack G., Kircheis G. and Butterworth R. F. (1999). "L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure." *Hepatology* **30**(3): 636-640.

- Rose C., Michalak A., Pannunzio M., Chatauret N., Rambaldi A. and Butterworth R. F. (2000). "Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure." *Hepatology* **31**(4): 872-877.
- Rosenberg G. A. (2002). "Matrix metalloproteinases in neuroinflammation." *Glia* **39**(3): 279-291.
- Rudiger H. A. and Clavien P. A. (2002). "Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver." *Gastroenterology* **122**(1): 202-210.
- Ruiter D. J., van der Meulen J., Brouwer A., Hummel M. J., Mauw B. J., van der Ploeg J. C. and Wisse E. (1981). "Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection." *Lab Invest* **45**(1): 38-45.
- Rutherford A. and Chung R. T. (2008). "Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration." *Semin Liver Dis* **28**(2): 167-174.
- Salmeron J. M., Tito L., Rimola A., Mas A., Navasa M. A., Llach J., Gines A., Gines P., Arroyo V. and Rodes J. (1992). "Selective intestinal decontamination in the prevention of bacterial infection in patients with acute liver failure." *J Hepatol* **14**(2-3): 280-285.
- Sass G., Koerber K., Bang R., Guehring H. and Tiegs G. (2001). "Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice." *J Clin Invest* **107**(4): 439-447.
- Sass G., Heinlein S., Agli A., Bang R., Schumann J. and Tiegs G. (2002). "Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis." *Cytokine* **19**(3): 115-120.
- Sathyaikumar K. V., Swapna I., Reddy P. V., Murthy Ch R., Dutta Gupta A., Senthilkumaran B. and Reddanna P. (2007). "Fulminant hepatic failure in rats induces

- oxidative stress differentially in cerebral cortex, cerebellum and pons medulla." *Neurochem Res* **32**(3): 517-524.
- Sawara K., Desjardins P., Chatauret N., Kato A., Suzuki K. and Butterworth R. F. (2009). "Alterations in expression of genes coding for proteins of the neurovascular unit in ischemic liver failure." *Neurochem Int* **55**(1-3): 119-123.
- Scallon B., Cai A., Solowski N., Rosenberg A., Song X. Y., Shealy D. and Wagner C. (2002). "Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(2): 418-426.
- Schliess F., Gorg B., Fischer R., Desjardins P., Bidmon H. J., Herrmann A., Butterworth R. F., Zilles K. and Haussinger D. (2002). "Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes." *FASEB J* **16**(7): 739-741.
- Schliess F., Foster N., Gorg B., Reinehr R. and Haussinger D. (2004). "Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes." *Glia* **47**(1): 21-29.
- Schmidt L. E. and Larsen F. S. (2006). "Prognostic implications of hyperlactatemia, multiple organ failure, and systemic inflammatory response syndrome in patients with acetaminophen-induced acute liver failure." *Crit Care Med* **34**(2): 337-343.
- Schmitz V., Dombrowski F., Prieto J., Qian C., Diehl L., Knolle P., Sauerbruch T., Caselmann W. H., Spengler U. and Leifeld L. (2006). "Induction of murine liver damage by overexpression of CD40 ligand provides an experimental model to study fulminant hepatic failure." *Hepatology* **44**(2): 430-439.
- Schousboe A. and Waagepetersen H. S. (2005). "Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity." *Neurotox Res* **8**(3-4): 221-225.

- Sekiyama K. D., Yoshiba M. and Thomson A. W. (1994). "Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis." *Clin Exp Immunol* **98**(1): 71-77.
- Shaked I., Tchoresh D., Gersner R., Meiri G., Mordechai S., Xiao X., Hart R. P. and Schwartz M. (2005). "Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators." *J Neurochem* **92**(5): 997-1009.
- Sherlock S., Summerskill W. H., White L. P. and Phear E. A. (1954). "Portal-systemic encephalopathy; neurological complications of liver disease." *Lancet* **267**(6836): 454-457.
- Sheron N., Kean H., Goka J., Alexander G. and Williams R. (2001). "Circulating acute phase cytokines and cytokine inhibitors in fulminant hepatic failure: associations with mortality and hemodynamics." *Clin Intensive Care* **12**: 127-134.
- Shimajima N., Eckman C. B., McKinney M., Sevlever D., Yamamoto S., Lin W., Dickson D. W. and Nguyen J. H. (2008). "Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure." *J Invest Surg* **21**(3): 101-108.
- Siegel G., Agranoff B., Albers RW. and Molinoff P. (1989). *Basic neurochemistry*. New York, Raven Press.
- Simeonova P. P., Gallucci R. M., Hulderman T., Wilson R., Kommineni C., Rao M. and Luster M. I. (2001). "The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride." *Toxicol Appl Pharmacol* **177**(2): 112-120.

- Simpson K. J., Lukacs N. W., McGregor A. H., Harrison D. J., Strieter R. M. and Kunkel S. L. (2000). "Inhibition of tumour necrosis factor alpha does not prevent experimental paracetamol-induced hepatic necrosis." *J Pathol* **190**(4): 489-494.
- Sinke A. P., Jayakumar A. R., Panickar K. S., Moriyama M., Reddy P. V. and Norenberg M. D. (2008). "NFkappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture." *J Neurochem* **106**(6): 2302-2311.
- Sirotkin H., Morrow B., Saint-Jore B., Puech A., Das Gupta R., Patanjali S. R., Skoultchi A., Weissman S. M. and Kucherlapati R. (1997). "Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome." *Genomics* **42**(2): 245-251.
- Skowronska M. and Albrecht J. (2012). "Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity." *Neurochem Int*.
- Skowronska M., Zielinska M., Wojcik-Stanaszek L., Ruskiewicz J., Milatovic D., Aschner M. and Albrecht J. (2012). "Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases." *J Neurochem* **121**(1): 125-134.
- Spadaro A., Lubrano E., Ferrara N. and Scarpa R. (2012). "Etanercept in psoriatic arthritis." *J Rheumatol Suppl* **89**: 74-76.
- Staub F., Baethmann A., Peters J., Weigt H. and Kempfski O. (1990). "Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability." *J Cereb Blood Flow Metab* **10**(6): 866-876.
- Sternlicht M. D. and Werb Z. (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.

- Streetz K., Leifeld L., Grundmann D., Ramakers J., Eckert K., Spengler U., Brenner D., Manns M. and Trautwein C. (2000). "Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure." *Gastroenterology* **119**(2): 446-460.
- Summerskill W. H., Davidson E. A., Sherlock S. and Steiner R. E. (1956). "The neuropsychiatric syndrome associated with hepatic cirrhosis and an extensive portal collateral circulation." *Q J Med* **25**(98): 245-266.
- Swain M., Butterworth R. F. and Blei A. T. (1992). "Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats." *Hepatology* **15**(3): 449-453.
- Takada Y., Ishiguro S., Fukunaga K., Gu M., Taniguchi H., Seino K. I., Yuzawa K., Otsuka M., Todoroki T. and Fukao K. (2001). "Increased intracranial pressure in a porcine model of fulminant hepatic failure using amatoxin and endotoxin." *J Hepatol* **34**(6): 825-831.
- Takahashi H., Koehler R. C., Brusilow S. W. and Traystman R. J. (1990). "Glutamine synthetase inhibition prevents cerebral oedema during hyperammonemia." *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **51**: 346-347.
- Takahashi H., Koehler R. C., Brusilow S. W. and Traystman R. J. (1991). "Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats." *Am J Physiol* **261**(3 Pt 2): H825-829.
- Talmor M., Hydo L. and Barie P. S. (1999). "Relationship of systemic inflammatory response syndrome to organ dysfunction, length of stay, and mortality in critical surgical illness: effect of intensive care unit resuscitation." *Arch Surg* **134**(1): 81-87.
- Terregino C. A., Quinn J. V. and Slotman G. J. (1997). "Pilot study of cytokines in emergency department patients with systemic inflammatory response syndrome." *Acad Emerg Med* **4**(7): 684-688.

- Tofteng F., Jorgensen L., Hansen B. A., Ott P., Kondrup J. and Larsen F. S. (2002). "Cerebral microdialysis in patients with fulminant hepatic failure." *Hepatology* **36**(6): 1333-1340.
- Tracey D., Klareskog L., Sasso E. H., Salfeld J. G. and Tak P. P. (2008). "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review." *Pharmacol Ther* **117**(2): 244-279.
- Tremblay M. E., Lowery R. L. and Majewska A. K. (2010). "Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience." *PLoS Biol* **8**(11): e1000527.
- Trey C. and Davidson C. S. (1970). "The management of fulminant hepatic failure." *Prog Liver Dis* **3**: 282-298.
- Vaquero J., Polson J., Chung C., Helenowski I., Schiodt F. V., Reisch J., Lee W. M. and Blei A. T. (2003). "Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure." *Gastroenterology* **125**(3): 755-764.
- Vaquero J., Belanger M., James L., Herrero R., Desjardins P., Cote J., Blei A. T. and Butterworth R. F. (2007). "Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survival in mice with acetaminophen toxicity." *Gastroenterology* **132**(1): 372-383.
- Vaquero J. (2012). "Therapeutic hypothermia in the management of acute liver failure." *Neurochem Int* **60**(7): 723-735.
- Vargas M. R. and Johnson J. A. (2009). "The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes." *Expert Rev Mol Med* **11**: e17.
- Voorhies T. M., Ehrlich M. E., Duffy T. E., Petito C. K. and Plum F. (1983). "Acute hyperammonemia in the young primate: physiologic and neuropathologic correlates." *Pediatr Res* **17**(12): 970-975.

- Walsh T. S., McLellan S., Mackenzie S. J. and Lee A. (1999). "Hyperlactatemia and pulmonary lactate production in patients with fulminant hepatic failure." *Chest* **116**(2): 471-476.
- Walz W. (1989). "Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment." *Prog Neurobiol* **33**(4): 309-333.
- Weigle C. G., Koehler R. C., Brusilow S. W. and Traystman R. J. (1990). "Arterial pH modulation of regional cerebral blood flow during hyperammonemia in dogs." *Am J Physiol* **259**(1 Pt 2): H34-41.
- Welbourne T. C., Childress D. and Givens G. (1986). "Renal regulation of interorgan glutamine flow in metabolic acidosis." *Am J Physiol* **251**(5 Pt 2): R859-866.
- Westergaard N., Sonnewald U. and Schousboe A. (1995). "Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited." *Dev Neurosci* **17**(4): 203-211.
- Wilkinson S. P., Arroyo V., Gazzard B. G., Moodie H. and Williams R. (1974). "Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure." *Lancet* **1**(7857): 521-524.
- Williams R. and Wendon J. (1994). "Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant liver failure." *Hepatology* **20**(1 Pt 2): S5-10S.
- Woll P. J. and Record C. O. (1979). "Lactate elimination in man: effects of lactate concentration and hepatic dysfunction." *Eur J Clin Invest* **9**(5): 397-404.
- Wright G., Shawcross D., Olde Damink S. W. and Jalan R. (2007). "Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension." *Metab Brain Dis* **22**(3-4): 375-388.

- Wu M. and Tsirka S. E. (2009). "Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Glia* **57**(11): 1204-1215.
- Wu Z., Han M., Chen T., Yan W. and Ning Q. (2010). "Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury." *Liver Int* **30**(6): 782-794.
- Yang L., Lindholm K., Konishi Y., Li R. and Shen Y. (2002). "Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways." *J Neurosci* **22**(8): 3025-3032.
- Yin M., Wheeler M. D., Kono H., Bradford B. U., Gallucci R. M., Luster M. I. and Thurman R. G. (1999). "Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice." *Gastroenterology* **117**(4): 942-952.
- Ytrebo L. M., Kristiansen R. G., Maehre H., Fuskevåg O. M., Kalstad T., Revhaug A., Cobos M. J., Jalan R. and Rose C. F. (2009). "L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure." *Hepatology* **50**(1): 165-174.
- Yumoto E., Higashi T., Nouse K., Nakatsukasa H., Fujiwara K., Hanafusa T., Yumoto Y., Tanimoto T., Kurimoto M., Tanaka N. and Tsuji T. (2002). "Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure." *J Gastroenterol Hepatol* **17**(3): 285-294.
- Zheng Y. B., Gao Z. L., Zhong F., Huang Y. S., Peng L., Lin B. L. and Chong Y. T. (2008). "Predictive value of serum-soluble CD154 in fulminant hepatic failure." *J Int Med Res* **36**(4): 728-733.
- Ziylan Y. Z., Uzum G., Bernard G., Diler A. S. and Bourre J. M. (1993). "Changes in the permeability of the blood-brain barrier in acute hyperammonemia. Effect of dexamethasone." *Mol Chem Neuropathol* **20**(3): 203-218.

- Zlokovic B. V. (2008). "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." *Neuron* **57**(2): 178-201.
- Zlydaszyk J. C. and Moon R. J. (1976). "Fate of ⁵¹Cr-labeled lipopolysaccharide in tissue culture cells and livers of normal mice." *Infect Immun* **14**(1): 100-105.
- Zwingmann C., Desjardins P., Hazell A., Chatauret N., Michalak A. and Butterworth R. F. (2002). "Reduced expression of astrocytic glycine transporter (Glyt-1) in acute liver failure." *Metab Brain Dis* **17**(4): 263-273.
- Zwingmann C., Chatauret N., Leibfritz D. and Butterworth R. F. (2003). "Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-C] nuclear magnetic resonance study." *Hepatology* **37**(2): 420-428.