

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal

Effets à long terme de la transplantation hépatocytaire sur la carcinogenèse
hépatique chez le rat Long-Evans Cinnamon

Par
Marianne Beaudin

Programme de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
maîtrise en Sciences Biomédicales

Décembre 2006

©Marianne Beaudin, 2006



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:
Effets à long terme de la transplantation hépatocytaire sur la carcinogenèse
hépatique chez le rat Long-Evans Cinnamon

Présenté par:
Marianne Beaudin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Denis Marleau
Président-rapporteur

Dr Michel Lallier
Directeur de recherche

Dr Steven R. Martin
Co-directeur de recherche

Dr Élie Haddad
Membre du jury

RÉSUMÉ

Introduction: Le rat Long-Evans Cinnamon (LEC) est un modèle animal de la maladie de Wilson causée par une mutation sur le gène *ATP7B*. Ces rats portent la même mutation sur le gène *Atp7b* et présentent une hépatite aiguë spontanée qui évolue en hépatite chronique et éventuellement, en hépatocarcinome (HCC) et cholangiocarcinome (CCC). La transplantation hépatocytaire (HT) chez le rat LEC a été étudiée afin de définir si elle pouvait prévenir le développement des cancers hépatiques.

Matériel&Méthodes: Les rats LEC-HT (n=20) subissaient une hépatectomie partielle (1/3) et une transplantation hépatocytaire à partir de rats Long-Evans donneurs à l'âge de 8 semaines. L'immunosuppression consistait en une injection intra-péritonéale de Tacrolimus pour 12 mois. Les rats LEC-contrôle (n=12) subissaient une hépatectomie partielle seule. À 18 mois, les rats étaient sacrifiés et le foie recueilli pour en étudier l'histologie, l'implantation des cellules avec l'immunohistochimie et la RT-PCR pour *Atp7b*. Les lésions pré-néoplasiques étaient identifiées avec l'immunohistochimie pour GST- π .

Résultats: Les rats LEC-HT et LEC-contrôle qui ont survécu à l'hépatite aiguë montraient une élévation des transaminases sériques jusqu'à 18 mois. La survie avant sacrifice était similaire dans les 2 groupes. Il y avait moins de HCC chez les LEC-HT (5% vs. 42%). Il y avait beaucoup moins de CCC chez les rats LEC-HT (65% vs. 92%). On retrouvait l'ARNm de l'*Atp7b* dans le foie de 4/15 rats LEC-HT à de faibles niveaux ($1.9 \pm 0.6\%$). Ces 4 rats ont développé seulement des nodules hyperplasiques. L'immunohistochimie pour l'*Atp7b* était positive chez ces 4 rats. Tous les rats montraient des lésions pré-néoplasiques.

Conclusions: La transplantation hépatocytaire, même à de faibles taux, peut retarder le développement de HCC et CCC chez le rat LEC. La présence de lésions pré-néoplasiques suggère que la carcinogenèse hépatique n'a pu être prévenue. Des études sur les stratégies d'implantation des hépatocytes sont nécessaires.

Mots-clés: transplantation hépatocytaire, rat LEC, hépatocarcinome, cholangiocarcinome.

ABSTRACT

Introduction: The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is an animal model of Wilson's disease, an autosomal recessively inherited disorder caused by a mutation in the *ATP7B* gene. These rats bear the same mutation in the *Atp7b* gene and suffer spontaneous hepatitis that evolves to chronic hepatitis and eventually, hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocellular carcinoma (CCC). Hepatocyte transplantation (HT) in LEC rats was performed to evaluate whether HT can prevent the development of liver tumor.

Methods: LEC-HT rats (n=20) received 1/3 partial hepatectomy and HT from donor Long-Evans rats at 8 weeks of age. Immunosuppression was maintained with intra-peritoneal injections of Tacrolimus for 12 months. Control LEC rats (n=12) received only 1/3 partial hepatectomy. At 18 months of age, rats were sacrificed and liver was harvested for histology, donor cell engraftment by immunostaining for ATP7B and RT-PCR for *Atp7b* mRNA. Pre-neoplastic lesions of HCC were confirmed by immunostaining for GST- π .

Results: Both HT rats and non-HT controls recovered from acute hepatitis, but showed persistent elevation of serum aminotransferases until sacrifice at 18 months of age. The survival before sacrifice was similar in both groups. Less HT rats developed HCC than controls (5% vs. 42%). All controls but one developed CCC (92%), whereas 13 out of 20 HT rats developed CCC (65%). Liver tissue expressed low levels of *Atp7b* mRNA ($1.9 \pm 0.6\%$) in 4 out of 15 HT rats. All 4 rats expressing detectable *Atp7b* mRNA developed only hyperplastic nodules. ATP7B-positive foci confirmed by immunohistochemistry were seen in these 4 rats. All rats showed GST- π positive modules and cholangiolar proliferation and fibrosis in non-tumoral tissues.

Conclusions: HT, even at low repopulation rats, may delay the development of liver tumors in LEC rats. The presence of pre-neoplastic lesions in non-tumoral tissues suggests that development of liver tumors could not be prevented completely. Studies using strategies to increase donor cell engraftment are needed.

Key words: hepatocyte transplantation, LEC rat, hepatocellular carcinoma, cholangiocellular carcinoma.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	p. 1
La maladie de Wilson	p. 1
Principes génétiques	p. 2
Principes moléculaires et cellulaires	p. 3
Présentation clinique	p. 6
Diagnostic	p. 9
Traitement	p. 11
Le rat Long-Evans Cinnamon	p. 16
Historique	p. 16
Évolution clinique	p. 18
Le cancer hépatique	p. 21
Généralités	p. 21
Carcinogenèse hépatique	p. 22
Cancer hépatique et maladie de Wilson	p. 29
Cancer hépatique et rat LEC	p. 30
La transplantation hépatocytaire	p. 33
Historique	p. 33
Transplantation hépatocytaire chez les modèles animaux	p. 35
Transplantation hépatocytaire chez le rat LEC	p. 37
Transplantation hépatocytaire chez les humains	p. 39
Hypothèses et objectifs de l'étude	p. 43

ARTICLE	p. 45
DISCUSSION	p. 73
CONCLUSION	p. 83
BIBLIOGRAPHIE	p. 85
ANNEXE 1: Demande d'autorisation de rédiger par article	p. 98
ANNEXE 2: Accord des coauteurs et permission de l'éditeur	p. 100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tests diagnostics les plus fréquemment utilisés pour la maladie de Wilson	p. 10
Tableau 2: Score de Nazer	p. 14
Tableau 3: Étude des 8 générations successives suivant l'identification du 1er rat LEC ictérique dans la 24e génération	p. 18

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Modèle proposé du produit du gène de la maladie de Wilson, l' <i>ATP7B</i>	p. 2
Figure 2: Métabolisme hépatocytaire du cuivre chez le sujet sain et chez le patient atteint de la maladie de Wilson	p. 5
Figure 3: Absorption, transport et excrétion du cuivre	p. 6
Figure 4: Anneau de Kayser-Fleisher	p. 8
Figure 5: Algorithme décisionnel pour le traitement de la maladie de Wilson selon le mode de présentation	p. 15
Figure 6: La progression de la maladie hépatique chronique, vers la cirrhose, les lésions pré-néoplasiques et le carcinome hépatocellulaire	p. 23
Figure 7: Étapes de la carcinogenèse hépatique	p. 24
Figure 8: Les effets du raccourcissement des télomères sur la carcinogenèse hépatique	p. 27
Figure 9: Le stress oxydatif	p. 29
Figure 10: Taux de nodules hyperplasiques, de carcinomes hépatocellulaire et de cholangiocarcinomes en fonction de l'âge chez les rats LEC non-traités	p. 31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Alanine aminotransférase sérique
AST	Aspartate aminotransférase sérique
ATP	Adénosine tri-phosphate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LE	Rat Long-Evans
LEA	Rat Long-Evans Agouti
LEC	Rat Long-Evans Cinnamon
LEC-HT	Rat Long-Evans Cinnamon ayant subi la transplantation hépatocytaire
OTC	Ornithine transcarbamylyase
PTK	Protéine tyrosine-kinase
PTT	Temps de prothrombine prolongé
T3	Hormone tri-iodothyronine
TM	Tétrathiomolybdate

INTRODUCTION

La maladie de Wilson

La maladie de Wilson a été décrite initialement en 1912 par Samuel Alexander Kinnier Wilson qui rapporta les cas de 4 de ses patients ainsi que 8 cas similaires déjà rapportés dans la littérature[1, 2]. Ces cas avaient en commun les symptômes neurologiques de la dégénérescence lenticulaire progressive ainsi que les manifestations cliniques de la cirrhose hépatique. Ce n'est que plusieurs années plus tard, en 1948, que Cummings démontra que ces atteintes étaient dues à une accumulation de cuivre dans le foie et le cerveau[3]. En 1952, Scheinberg et Gitlin décrivent une déficience en céruloplasmine dans le sérum des patients qui sont désormais définis comme atteints de la maladie de Wilson[4]. Un des premiers traitement médical pour cette condition a été proposé en 1956 par Walshe et consistait en un chélateur du cuivre, la pénicillamine, et demeure encore aujourd'hui une option thérapeutique valable[5].

Actuellement, la maladie de Wilson est caractérisée comme un spectre de manifestations hépatiques, neurologiques, psychiatriques et ophtalmiques. Sa prévalence est approximée à 1:30 000 naissances, et ce parmi tous les groupes ethniques[6]. Son incidence mondiale est d'environ 15 à 25 par millions d'habitants. Les personnes atteintes sont homozygotes ou encore hétérozygotes composées. On estime le taux de porteurs hétérozygotes à 1:100[7, 8].

Principes génétiques

En 1960, l'étude de nombreuses familles atteintes de la maladie a permis d'en révéler sa nature autosomale récessive[9] et en 1985, on isolait le chromosome 13q14 comme étant porteur de la mutation responsable de la maladie[10]. Ce n'est qu'au début des années 1990 qu'on découvrait que le gène de la maladie de Wilson, l'*ATP7B*, sert à la fabrication d'une pompe trans-membranaire ATPase de type P nécessaire au transport du cuivre dans la cellule[11]. La région codante du gène mesure 4.1 kB avec un ARNm de 8 kB. Cette pompe consiste en 1443 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 160 kD. Il s'y trouve 6 motifs liant le cuivre, un motif phosphorylatif, une région liant l'ATP et 8 motifs trans-membranaires[6] (**fig. 1**).

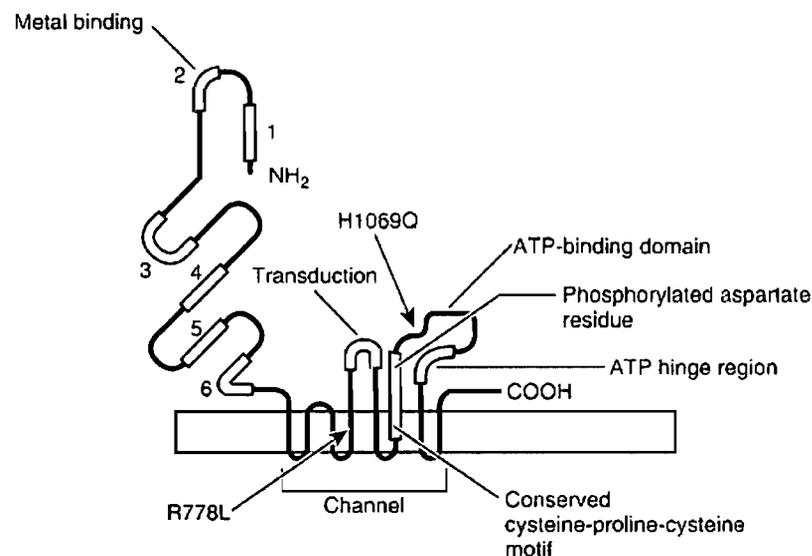


Fig. 1. Modèle proposé du produit du gène de la maladie de Wilson, l'*ATP7B*.
(Tiré et modifié de *Trends Genet* 1994[12]).

Plus de 200 mutations du gène *ATP7B* ont été répertoriées à travers le monde et environ la moitié sont des mutations de type non-sens et largement confinées aux domaines trans-membranaires. Certaines mutations ont une prévalence plus importante dans certaines parties du monde dont la mutation H1069Q en Europe du nord et la mutation A778L chez les asiatiques[13]. Il a cependant été démontré qu'une mutation donnée n'était pas prédictrice de la sévérité de l'atteinte chez les individus homozygotes pour cette même mutation[14].

Principes moléculaires et cellulaires

Le cuivre est un élément-trace essentiel à plusieurs enzymes dont la lysyl oxidase servant à la fabrication des tissus conjonctifs, la superoxide dismutase servant à l'élimination des radicaux libres, la cytochrome-C-oxidase servant au transfert d'électrons, la tyrosinase servant à la production de pigments et la dopamine β -mono-oxygénase servant à la neurotransmission[6, 15]. Le cuivre alimentaire est principalement retrouvé dans le foie, les fruits de mer, le chocolat, les noix et les champignons[16]. Il est absorbé dans le tractus digestif par l'estomac et le duodénum[13]. La principale voie d'excrétion du cuivre est via la bile, une partie minime étant excrétée dans l'urine en de rares circonstances. Le foie est l'organe jouant le plus grand rôle dans le métabolisme du cuivre, étant le principal lieu de storage et le facteur déterminant quant à l'élimination biliaire du cuivre[17]. Il n'existe pas de cycle entéro-hépatique du cuivre et la totalité du cuivre excrété dans la bile se retrouve donc dans les selles sous une forme non-réabsorbable.

Le transport du cuivre à l'intérieur des hépatocytes se fait grâce à une protéine membranaire appelée *Ctr1*. Cette protéine est fixée à la membrane baso-latérale de l'hépatocyte et possède une affinité très élevée pour le cuivre[18, 19]. Suite à son entrée dans la cellule, le cuivre est lié à une protéine-chaperone, la métallo-chaperone, qui permet de faire circuler le cuivre à travers la cellule jusqu'à ses diverses destinations et empêche ainsi sa chélation intra-cellulaire[20, 21]. La métallo-chaperone *Atox1* transporte le cuivre jusqu'à la pompe ATPase *ATP7B* avec laquelle elle interagit directement[22-24]. Il existe également d'autres métallo-chaperones (*Cox17*, *Ccs1*) qui possèdent une structure moléculaire de base semblable à celle de *Atox1* et qui dirigent le cuivre à l'intérieur de la cellule[25]. Une portion du cuivre intra-cellulaire se retrouve aussi lié aux métallothionéines qui jouent probablement un rôle protecteur lorsqu'une grande quantité de cuivre est présente dans la cellule[26, 27]. Une fois arrivé à la pompe *ATP7B*, généralement située sur l'appareil de trans-Golgi, le cuivre est incorporé dans l'apocéruloplasmine pour passer dans la circulation sanguine. En situation d'excès de cuivre, le cuivre se retrouve déplacé vers un compartiment cytoplasmique où il s'accumule dans des vésicules avant d'être excrété dans la bile via la membrane canaliculaire[28, 29] (**fig. 2**).

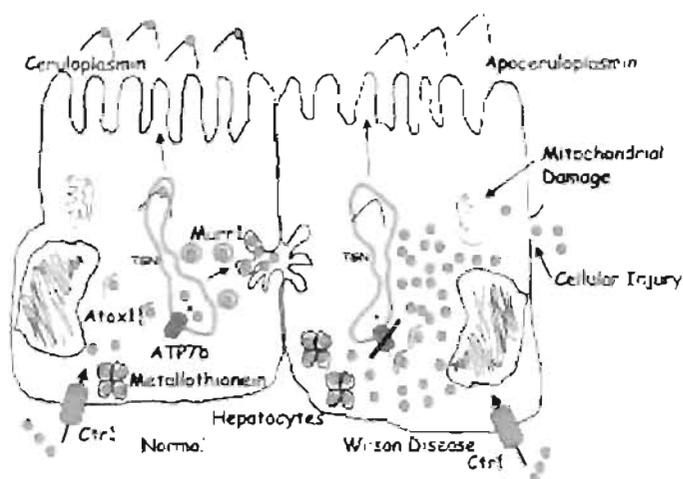


Fig. 2. Métabolisme hépatocytaire du cuivre chez le sujet sain (gauche) et chez le patient atteint de la maladie de Wilson (droite). (Tiré de *Hepatology* 2003[17]).

Tel que déjà mentionné, les patients atteints de la maladie de Wilson présentent des mutations sur l'*ATP7B* qui modifient le mécanisme expliqué précédemment. Ces mutations peuvent avoir un impact sur les deux mécanismes d'excrétion du cuivre, soient via la circulation sanguine et via la bile. Premièrement, l'absence de pompes *ATP7B* fonctionnelles limite l'incorporation du cuivre dans l'apoceruloplasmine et s'en suit une apoprotéine excrétée et rapidement dégradée. Ceci explique la faible quantité de céruloplasmine sérique observée dans la maladie de Wilson. Par ailleurs, la céruloplasmine est une ferroxidase jouant un rôle important dans le métabolisme du fer, amenant le fer sous sa forme Fe^{2+} vers sa forme Fe^{3+} qui peut ensuite se lier à la transferrine pour entrer dans la circulation sanguine[30-32] (fig. 3). Deuxièmement, d'autres mutations causent surtout un défaut de translocation de l'*ATP7B* de l'appareil de trans-Golgi vers les vésicules péri-canaliculaires[33].

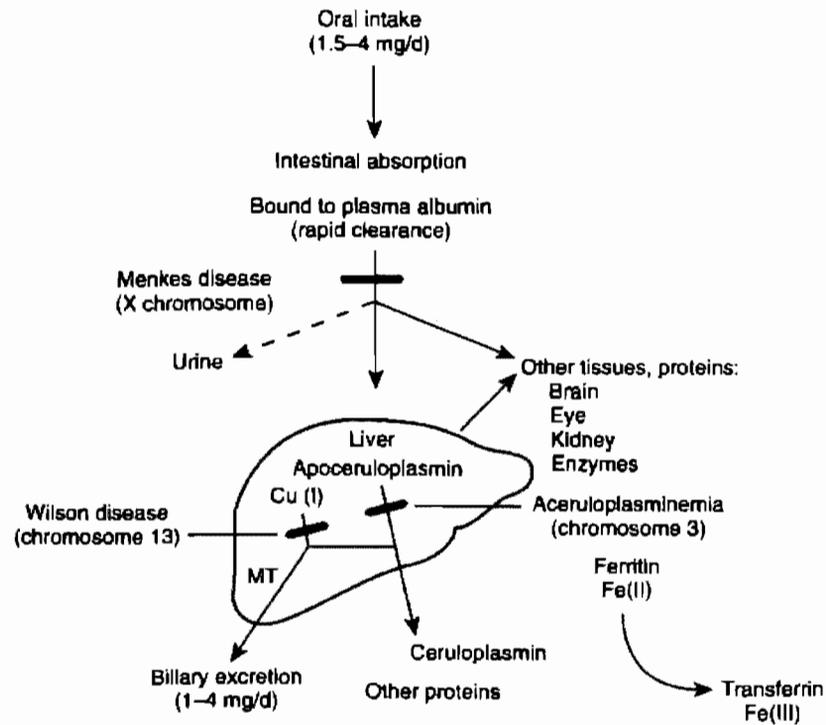


Fig. 3. Absorption, transport et excrétion du cuivre. (Tiré de *Am J Hum Genet* 1995[32]).

L'accumulation intra-hépatocytaire de cuivre causée par cette excrétion insuffisante entraîne des dommages cellulaires oxydatifs, l'activation des voies apoptotiques, la fuite plasmatique de cuivre à travers la membrane cellulaire endommagée et l'accumulation du cuivre dans plusieurs tissus.

Présentation clinique

L'âge de présentation de la maladie varie énormément et se situe entre 5 à 40 ans. Toutefois, quelques cas ont été observés chez de jeunes enfants, mais rarement avant l'âge de 3 ans. Ceci reflète probablement la capacité du foie à entreposer des

excès de cuivre. Quelques cas ont aussi été rapportés chez des adultes âgés de plus de 50 ans[6]. Le mode de présentation est également très variable et est bien souvent fonction de l'âge de présentation. Globalement, 45% des patients se présentent avec une atteinte hépatique alors que 35% se présentent avec des symptômes neurologiques, 10% avec des symptômes psychiatriques et le dernier 10% avec des atteintes diverses telles que l'anémie hémolytique, l'ictère ou la cardiomyopathie[7]. Cependant, les enfants se présentent surtout avec une atteinte hépatique vers l'âge moyen de 10 ans alors que les adultes se présentent principalement avec une atteinte neurologique vers l'âge de 20 à 30 ans[34].

L'atteinte hépatique se retrouve sur un spectre allant de l'asymptomatique élévation des enzymes hépatiques, en passant par l'hépatite chronique, la cirrhose hépatique et l'hépatite fulminante. Chez les enfants, l'hépatite chronique est due à la maladie de Wilson dans 8 à 10% des cas. Il est donc impératif de distinguer cette condition de l'hépatite virale et de l'hépatite auto-immune[7, 35]. Certains adolescents, surtout des filles, se présentent avec une cirrhose hépatique décompensée en hépatite fulminante et le pronostic pour cette condition est très sombre en l'absence d'une transplantation hépatique[36, 37]. Contrairement à d'autres formes de cirrhoses, telles que celles causées par l'hémochromatose ou l'hépatite virale, sa progression en carcinome hépatocellulaire est rare[38]. Ce sujet sera abordé ultérieurement.

La présentation avec symptômes neurologiques se divise principalement en 2 grandes catégories: les troubles du mouvement et la dystonie spastique[39]. Ces troubles constituent des symptômes «parkinsoniens» et témoignent de l'accumulation de cuivre dans les ganglions de la base cérébraux[40, 41]. Les troubles du mouvement incluent tremblements et troubles de coordination et surviennent généralement en premier. Les troubles spastiques incluent un faciès rigide, des troubles de la démarche, de la dysarthrie, une hypersalivation ainsi que des troubles de la déglutition.

Les symptômes psychiatriques sont très variables allant du trouble de comportement jusqu'à la psychose. On considère généralement que l'apparition de symptômes psychiatriques qui précède de 5 ans l'apparition de symptômes neurologiques n'est probablement pas reliée à la maladie de Wilson[42].

L'accumulation de cuivre au niveau ophtalmique constitue aussi un mode de présentation clinique. Les anneaux de Kayser-Fleisher sont observés lorsque le cuivre se dépose sur la membrane de Descemet (fig. 4).

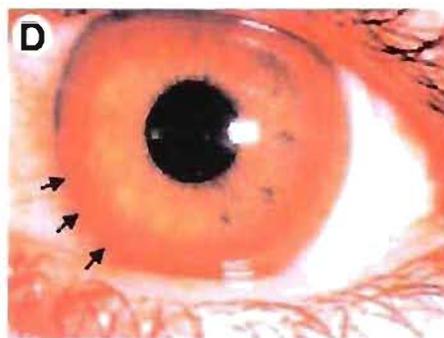


Fig. 4. Anneau de Kayser-Fleisher (Tiré de *Gastroenterology* 2003[13]).

Ils peuvent être visibles à l'oeil nu lorsque très importants, sinon ils sont observés à l'aide de la lampe à fente. Ils sont absents chez 15 à 50% des patients qui se présentent avec une atteinte exclusivement hépatique alors qu'ils sont absents chez seulement 5% des patients qui se présentent avec une atteinte neurologique et psychiatrique[6]. Par contre, ils ne sont pas spécifiques à la maladie de Wilson et peuvent témoigner de plusieurs maladies hépatiques chroniques, surtout celles ayant une forte composante cholestatique. Une autre atteinte ophtalmique consiste en la déposition de cuivre au niveau du cristallin; on l'appelle «*sunflower cataract*». Contrairement à la cataracte sénile, elle n'entraîne pas de déficits visuels[6, 43].

Il existe plusieurs autres manifestations extra-hépatiques et extra-neurologiques qui peuvent accompagner la maladie de Wilson. Toutes résultent d'une déposition anormale de cuivre dans les tissus. L'atteinte rénale peut engendrer un syndrome de Fanconi, des néphrolithiases et une forme de rachitisme vitamine D-résistant. On retrouve également les cardiomyopathies et les troubles du rythme cardiaque, les arthrites, les pancréatites, etc.[6].

Diagnostic

Le diagnostic de la maladie de Wilson demeure encore aujourd'hui assez complexe. Il n'existe pas d'algorithme diagnostique clair. Le diagnostic se fait en regroupant les signes, symptômes et les différents tests diagnostiques disponibles.

L'examen avec la lampe à fente constitue aussi une étape importante de l'investigation. Les tests les plus fréquemment utilisés sont la céruloplasmine sérique, le cuivre sérique et le cuivre urinaire (**tableau 1**).

	Adultes atteints de la Maladie de Wilson	Adultes sains
Céruloplasmine sérique (mg/L)	0-200	200-350
Cuivre sérique ($\mu\text{mol/L}$)	3-10	11-24
Cuivre urinaire ($\mu\text{mol/j}$)	>1.6	<0.6
Cuivre hépatique ($\mu\text{g/g}$ poids sec)	>200	20-50

Tableau 1. Tests diagnostics les plus fréquemment utilisés pour la maladie de Wilson (Tiré et modifié de *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease 2002[6]*).

La pénicillamine, un des traitements proposés pour la maladie de Wilson, peut également être utilisée à des fins diagnostiques. En effet, l'excrétion urinaire de cuivre sur 24h est mesurée après l'administration de pénicillamine (500 mg en 2 doses aux 12 heures). Bien que l'excrétion urinaire de cuivre peut être augmentée jusqu'à 20 fois de la valeur normale chez les sujets sains, l'augmentation est encore plus substantielle chez les patients atteints de la maladie de Wilson[44].

Si un doute persiste, la biopsie hépatique peut s'avérer être un outil diagnostique intéressant. La mesure du cuivre hépatique est considérée plus fiable dans les premiers stades de la maladie de Wilson puisque la distribution en est plus diffuse. Dans les stades plus avancés de la maladie, le cuivre est distribué de façon inégale

dans le parenchyme hépatique[45]. Les trouvailles histologiques varient aussi en fonction du stade de la maladie. Initialement, on retrouve de la stéatose, de la nécrose focale, de la déposition de glycogène dans les noyaux hépatocytaires et quelques fois, des corps apoptotiques. À mesure que l'inflammation chronique s'installe, on retrouve de la fibrose périportale. La cirrhose de la maladie de Wilson est typiquement micro-nodulaire[6].

À l'heure actuelle, plus de 200 mutations du gène de la maladie de Wilson sont répertoriées dans les banques de données[46-48]. Pour cette raison, l'analyse mutationnelle n'est que peu utile cliniquement. Au moins 2 caractéristiques typiques, cliniques ou biochimiques, doivent être présentes avant d'entreprendre ces tests génétiques. L'identification d'au moins une mutation est habituellement suffisante pour poser le diagnostic, en présence de symptômes cliniques.

Traitement

Il existe actuellement 3 médicaments pour traiter la maladie de Wilson et un quatrième qui est présentement en cours d'investigation et qui paraît très prometteur.

Le premier est la pénicillamine qui consiste en un chélateur du cuivre et agit en mobilisant le cuivre du foie et autres endroits d'entreposage pour en faire

l'excrétion dans l'urine[5]. Il comporte des effets secondaires qui peuvent être très délétaires et qui en limitent l'utilisation. Chez des patients se présentant avec symptômes neurologiques, il y a un risque potentiel d'aggravation des symptômes dans 50% des cas. Cette aggravation peut persister chez plus de 50% de ces patients[49]. Les autres effets secondaires dignes de mention sont l'hypersensibilité, l'aplasie médullaire, la toxicité rénale, le lupus érythémateux disséminé et le syndrome de Goodpasture[16, 50].

Le deuxième est la trientine qui est également un chélateur du cuivre et agit de façon similaire à la pénicillamine, mais de façon moins agressive[51]. Ses effets secondaires sont nettement moindres, avec un risque d'aggravation des symptômes neurologiques de 20% et une protéinurie dans 2 à 5% des cas[50, 52]. Les autres effets secondaires de la pénicillamine peuvent être rencontrés mais à une fréquence beaucoup moins importante.

Le troisième médicament est le zinc qui agit en inducteur des métallothionéines des cellules intestinales et inhibe ainsi l'absorption intestinale du cuivre[53-56]. Le principal effet secondaire est l'irritation gastrique dans 5 à 10% des cas et peut souvent être évité en retardant la dose matinale au milieu de l'avant-midi[53]. Un autre des effets secondaires est l'anémie microcytaire ferriprive. Le zinc est souvent employé en combinaison avec la trientine.

Le quatrième médicament qui est encore actuellement à l'étude est le tétrathiomolybdate (TM). Cette molécule forme un complexe avec une protéine et le cuivre[57]. Donnée avec les repas, elle utilise les protéines alimentaires et donnée sans les repas, elle utilise l'albumine sérique. Des études antérieures ont démontré son bénéfice chez les patients se présentant avec des symptômes neurologiques[52, 58-60] et son efficacité chez les patients se présentant avec des symptômes hépatiques est en investigation.

Le traitement de maintien débute habituellement après 2 à 4 mois de thérapie avec le premier agent pharmacologique[42]. Cette phase du traitement se fait avec la trientine ou le zinc seul. Le zinc est souvent préféré à la trientine dû à son profil pharmacologique plus sécuritaire[61].

Lorsque les patients se présentent avec une hépatite fulminante et une insuffisance hépatique rapidement progressive, ils doivent être évalués pour une transplantation hépatique urgente. Le score de Child-Pugh habituellement utilisé pour évaluer le besoin de greffe n'est pas approprié chez les patients atteints de la maladie de Wilson[62]. Le mode d'évaluation proposé est le score de Nazer qui se calcule à l'aide de la bilirubine totale, l'aspartate aminotransférase (AST) et le temps de prothrombine prolongé (PTT)[63] (**tableau 2**).

Analyses	Valeur normale	Score				
		0	1	2	3	4
Bilirubine sérique	0.2-1.2 mg/dL	<5.8	5.8-8.8	8.8-11.7	11.7-17.5	>17.5
AST	10-35 UI/L	<100	100-150	151-200	201-300	>300
PTT (sec)	-	<4	4-8	9-12	13-20	>20

Tableau 2. Score de Nazer (Tiré et modifié de *Gut 1986[63]*).

Dans l'article original par Nazer *et al.*, il est rapporté qu'un patient ayant un score égal ou inférieur à 6 présente de fortes probabilités de survivre à l'hépatite aiguë avec le traitement à la pénicillamine seulement alors que ceux ayant un score de 7 et plus nécessitent une transplantation. Une autre équipe a par la suite démontré un succès thérapeutique avec la combinaison de trientine et zinc chez des patients ayant un score de Nazer aussi élevé que 9[62]. Par ailleurs, les scores de MELD dans la population adulte et PELD dans la population pédiatrique sont également utilisés, bien que leur usage ne soit pas dédié spécifiquement à l'insuffisance hépatique due à la maladie de Wilson.

Finalement, un algorithme décisionnel permet de guider le choix thérapeutique selon le mode de présentation clinique du patient (**fig. 5**). En consultant cet algorithme, on doit tenir compte du fait que la tétrathiomolybdate (TM) est encore actuellement à l'étude et que son utilisation n'a donc pas encore été entérinée par la *Food and Drug Administration*.

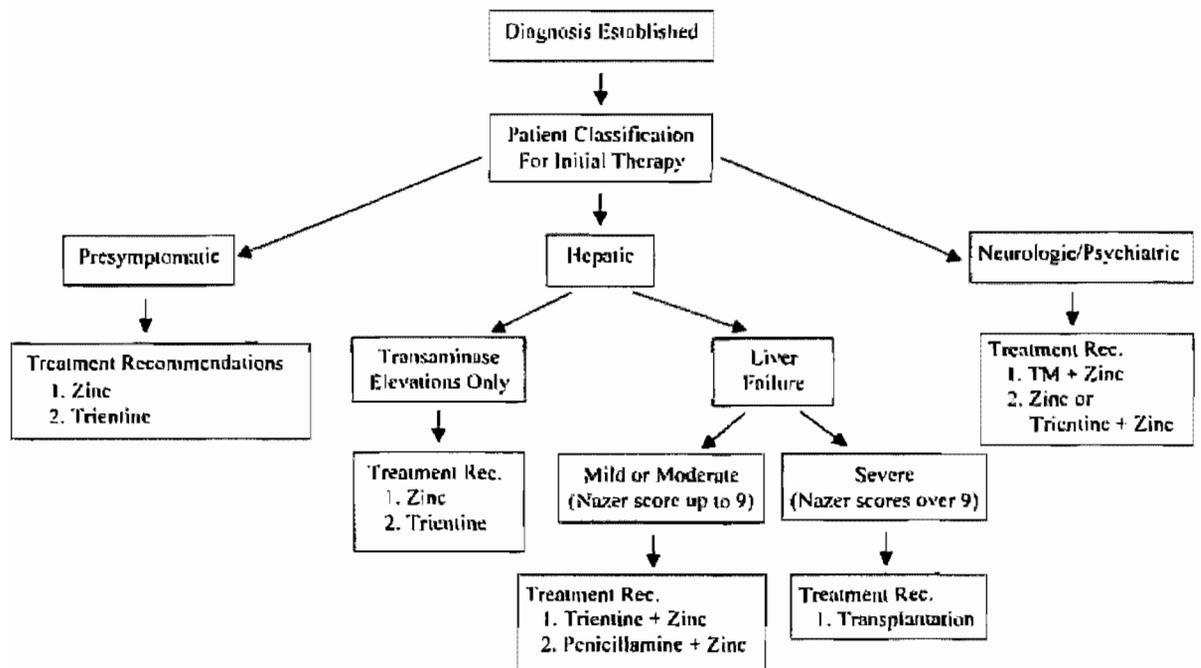


Fig. 5 Algorithme décisionnel pour le traitement de la maladie de Wilson selon le mode de présentation (Tiré de *Journal of Hepatology* 2005[42]).

Le rat Long-Evans Cinnamon

Il existe 3 modèles animaux pour l'étude de la maladie de Wilson: la souris «*Jackson milk toxic*»[64], la souris présentant une délétion du gène *Atp7b*[65] et le rat Long-Evans Cinnamon (LEC)[66]. Le rat LEC est le modèle le plus utilisé dans la littérature et celui auquel notre groupe de recherche s'est intéressé.

Historique

Le rat LEC a été développé au Japon par le groupe de Yoshida de l'Université de Hokkaido en 1975[67]. Les rats LEC ont été conçus à partir des rats Long-Evans (LE) sur lesquels des études portant sur la leucémie étaient effectuées par un autre groupe de recherche japonais. Les chercheurs du groupe de Yoshida constatèrent que les rats LE possédaient des pelages de 3 couleurs différentes, soient brun-cannelle, brun-noir ou agouti (alternance de bandes pâles et foncées donnant une apparence tachetée). Tous avaient le ventre d'une couleur blanche ou crème. Des croisements à l'intérieur de la colonie des rats LE ont été effectués pour tenter d'isoler les 3 couleurs de pelage. De ces croisements, 2 souches de rats ont été isolées et leurs colonies ont été maintenues. Les rats Long-Evans Agouti (LEA) qui ont un pelage brun-agouti avec un ventre blanc et le rat LEC avec un pelage brun-cannelle et un ventre blanc. Les rats LE et LEA sont souvent utilisés comme population-contrôle du rat LEC.

C'est en 1984 que l'association entre une hépatite spontanée et un ictère sévère a été constatée chez un rat mâle de la 24^e génération de la colonie LEC. Cet ictère s'est développé à l'âge de 149 jours et bien que ce rat était issu d'une portée de 6 rats, il a été le seul à montrer de tels symptômes. Ce rat est mort une semaine après l'apparition de l'ictère, mais s'était déjà accouplé et avait engendré une portée de la 25^e génération avant le début de ses symptômes. Cette portée de rats de la 25^e génération a été croisée avec les autres portées de la 25^e génération de la façon habituelle, sans faire de sélection particulière. Tous les rats étaient désormais inspectés quotidiennement pour des signes d'ictère. Des rats ictériques ont été trouvés dans chaque génération suite à l'identification de ce premier rat ictérique. De plus, la fréquence des rats ictériques augmentait d'une génération à l'autre (**tableau 3**). On notait également que des rats ictériques étaient issus de rats qui allaient plus tard devenir ictériques ou non.

Les caractéristiques des rats ictériques étaient compatibles avec une hépatite aiguë: saignements sous-cutanés, oligurie, bilirubinurie et perte de poids. Ces symptômes apparaissaient vers l'âge moyen de 4 mois (88 à 149 jours d'âge) et entraînaient habituellement la mort en l'espace d'une semaine. Les trouvailles à l'autopsie étaient des tissus sous-cutanés jaunes, un foie atrophique, une rate hypertrophique et des reins jaunes.

Génération	Nombre de portées	Fréquence de rats ictériques (en %)	Début de l'ictère (en nombre de jours après la naissance)
F24	1	16.7	149
F25	1	50.0	89
F26	1	100.0	139
F27	3	66.7	88
F28	3	95.0	129
F29	5	88.6	110
F30	8	87.7	111
F31	4	75.8	103

Tableau 3. Étude des 8 générations successives suivant l'identification du 1er rat LEC ictérique dans la 24e génération (Tiré et modifié de *The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer 1991*[67]).

Évolution clinique

L'évolution clinique des rats LEC est décrite à partir de la colonie originale des rats LEC de l'Université de Hokkaido[68]. Environ 80% des rats LEC développent une hépatite aiguë à l'âge de 4 mois. De ces rats, seulement 20% survivent alors que les autres 80% ont une hépatite fulminante et en meurent. Des survivants, la moitié ont une récurrence d'hépatite qui est habituellement fulminante et entraînant la mort et l'autre moitié développent invariablement une hépatite chronique. La presque totalité des rats avec une hépatite chronique développent un cancer hépatique (hépatocarcinome et/ou cholangiocarcinome) vers l'âge de 12 mois. Les premiers 20% des rats LEC qui ne développent pas d'hépatite aiguë à l'âge de 4

mois évoluent tout de même vers des hépatites chroniques et éventuellement, des cancers hépatiques. L'apparition d'un cancer hépatique dans la maladie de Wilson est rare, contrairement au cas du rat LEC. Ce sujet sera abordé ultérieurement. Aussi à la différence des humains avec la maladie de Wilson, les rats LEC ne présentent aucun symptômes neurologiques ou psychiatriques, quoique ces derniers soient difficilement évaluables chez les rats.

Au niveau biochimique, les rats LEC présentent une élévation des enzymes hépatiques sériques (AST/ALT) et de la bilirubine totale sérique et un abaissement de l'albumine et des protéines totales sériques suite à l'apparition de l'hépatite aiguë. Ils ont également un niveau abaissé de céruloplasmine sérique et ce, peu après la naissance. Les rats LEC accumulent également du cuivre au niveau du foie, des reins et du cerveau, phénomène qui n'est pas retrouvé dans la population-contrôle de rats LEA. Le taux d'excrétion biliaire du cuivre est aussi abaissé chez les rats LEC.

Au niveau histopathologique, il existe plusieurs similitudes entre les trouvailles chez le rat LEC et l'humain atteint de la maladie de Wilson. Chez le rat LEC ainsi que chez l'homme, on observe de la stéatose, des inclusions de gouttelettes lipidiques à l'intérieur du cytoplasme des hépatocytes et du pléomorphisme des mitochondries. Toutefois, il existe une différence entre les noyaux hypertrophiques des hépatocytes chez les rats LEC et les noyaux gonflés de glycogène des hépatocytes dans la maladie de Wilson. Les rats LEC développent une

cholangiofibrose importante dans le cadre de leur hépatite chronique alors qu'on n'observe pas un tel phénomène dans la cirrhose micro-nodulaire de l'homme.

Au niveau génétique, le rat LEC présente une délétion de 900 paires de base à l'extrémité 3' de la région codante et 400 paires de bases dans la région non-traduite du gène de l'*Atp7b*[69]. L'homologie entre le gène humain de l'*ATP7B* et le gène du rat LEC de l'*Atp7b* est évaluée à environ 82%[70]. Le mode de transmission est également autosomal récessif chez le rat LEC[71].

Une dernière caractéristique qui rend le rat LEC comparable à l'humain atteint de la maladie de Wilson est sa réponse au traitement. Effectivement, l'administration orale de pénicillamine chez le rat LEC à partir de l'âge de 3 mois a réussi à prévenir l'apparition d'hépatites aiguës, augmenter l'excrétion urinaire de cuivre, diminuer l'accumulation hépatique de cuivre et prévenir la carcinogenèse hépatique[72, 73]. Des résultats similaires sont plus tard obtenus en traitant les rats LEC avec la trientine[74].

Le cancer hépatique

Généralités

Le carcinome hépatocellulaire est l'un des cancers les plus répandus à l'échelle mondiale. Il s'agit du cinquième cancer le plus fréquent. La *American Cancer Society* estimait à 667 000 le nombre de nouveaux patients diagnostiqués avec un cancer hépatique à travers le monde en 2005[75]. Il se classe en quatrième position quant au taux de mortalité, derrière le cancer du poumon, de l'estomac et du colon[76]. Malgré l'existence de potentiels traitements curatifs, le taux de létalité se classe quant à lui en deuxième position (derrière le cancer du pancréas) avec une survie moyenne à 5 ans mesurée à 4.4%[77]. Son haut taux de létalité est expliqué par sa résistance à certains agents thérapeutiques, son manque de marqueurs moléculaires aidant à indiquer les cancers potentiellement résequables chirurgicalement et son association fréquente avec une maladie hépatique sous-jacente qui restreint l'usage des agents chimiothérapeutiques[78].

Le principal facteur de risques est l'infection aux virus de l'hépatite C et/ou B qui est reliée à plus de 80% des cas de carcinomes hépatocellulaires dans le monde. D'autres facteurs de risques majeurs sont la consommation d'alcool, le tabagisme et certaines maladies métaboliques hépatiques telles que l'hémochromatose[76, 77].

Il existe plusieurs types de cancers hépatiques primaires, mais le carcinome hépatocellulaire est le type histologique le plus fréquent, représentant 83% de l'ensemble des cancers hépatiques[75, 79].

Plusieurs modalités thérapeutiques sont décrites pour le traitement du cancer hépatique. Dans les cas où la maladie est localement limitée, la résection chirurgicale est le traitement ayant le plus grand potentiel curatif. D'autres traitements sont l'injection d'éthanol, la chimio-embolisation et la radiothérapie. La transplantation hépatique représente une option thérapeutique radicale et souvent définitive, mais les critères de sélection pour accéder à ce traitement sont très restrictifs[77, 78].

Carcinogenèse hépatique

De façon générale, peu importe le stimulus qui entraîne le carcinome hépatocellulaire, les étapes qui y mènent sont les mêmes. Suite aux agressions répétées sur les hépatocytes, ceux-ci nécrosent et une re prolifération s'en suit. Après plusieurs cycles de destruction-regénération, la maladie hépatique chronique s'installe pour finalement faire place à la cirrhose hépatique. On définit la cirrhose hépatique comme la formation de nodules hépatiques anormaux entourés de zones de déposition de collagène et de tissus cicatriciels. Ces nodules deviennent ensuite des nodules d'hépatocytes hyperplasiques puis des nodules d'hépatocytes dysplasiques. À la différence des nodules hyperplasiques, les nodules dysplasiques

sont constitués d'hépatocytes aux caractéristiques cytologiques anormales. Elles présentent un cytoplasme clair dû à l'accumulation de lipide ou de glycogène, elles sont parfois multinucléées et elles sont organisées avec une architecture différente. Il s'agit de lésions pré-néoplasiques puisqu'ultimement, ces nodules seront remplacés par des lésions de carcinome hépatocellulaire. Ces lésions possèdent alors la capacité d'envahir les tissus et vaisseaux adjacents et peuvent donc avoir un potentiel métastatique. On peut ensuite classer ces carcinomes hépatocellulaires selon le niveau de différenciation des cellules qui le constituent. En ordre de malignité croissante, on retrouve les cellules bien différenciées, les cellules moyennement bien différenciées et finalement les cellules peu différenciées [78]. Ces étapes sont résumées dans la figure 6.

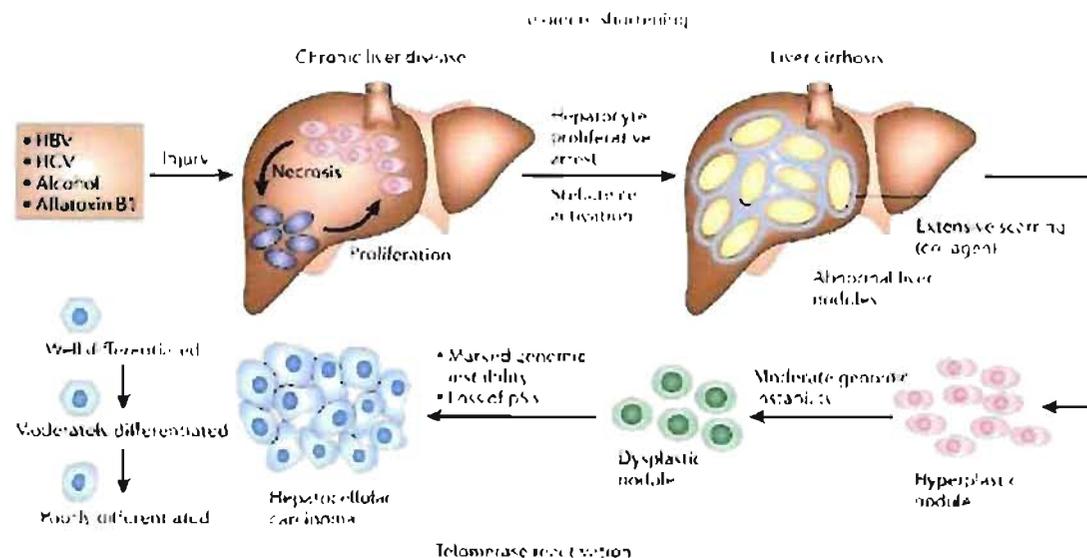


Fig. 6. La progression de la maladie hépatique chronique, vers la cirrhose, les lésions pré-néoplasiques et finalement le carcinome hépatocellulaire (Tiré de *Nature Cancer Reviews* 2006 [78]).

Une hypothèse sur les étapes de la carcinogenèse hépatique au niveau cellulaire, moléculaire et génétique est résumée dans la figure 7. Tout d'abord, un agent agresseur est mis en contact avec les hépatocytes normaux. Dans le cas de la maladie de Wilson, il s'agit de l'accumulation intra-hépatique de cuivre. Des études récentes ont démontré l'association entre le stress oxydatif, l'inflammation chronique et le développement de néoplasies[80-84]. Le stress oxydatif et la peroxydation lipidique liés à l'accumulation de cuivre ont déjà été démontrés dans la maladie de Wilson[81, 85]. Par la suite, ces agresseurs causeraient des mutations génétiques qui altéreraient éventuellement la fonction de certains gènes, tel que le p53 qui régit les réparations de l'ADN, les cycles cellulaires et l'apoptose[86].

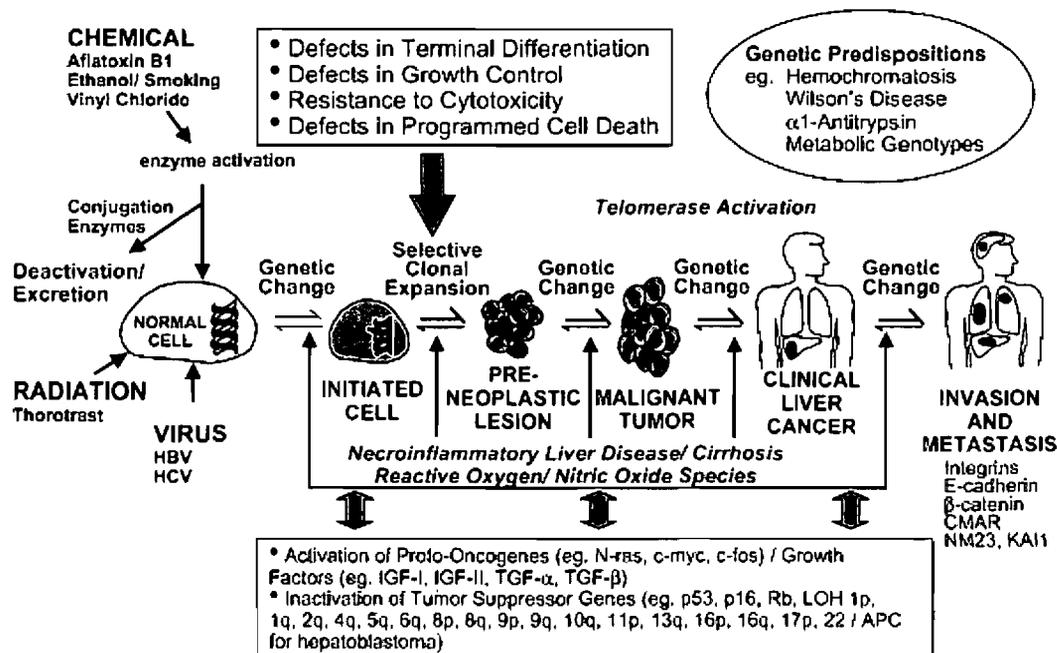


Fig. 7. Étapes suggérées de la carcinogenèse hépatique (Tiré de *Toxicology* 2002[76])

Il est reconnu que le gène p53 joue un rôle important dans la carcinogenèse hépatique, toutefois il persiste une grande controverse quant à son rôle en tant qu'initiateur ou facilitateur de la progression du carcinome hépatocellulaire.

Les dommages faits à l'ADN stimulent la transcription, la traduction et la translocation nucléaire du gène p53. Une fois dans le noyau, le p53 agit alors comme un facteur de transcription se liant à l'ADN et permettant l'arrêt de cycles cellulaires et l'apoptose cellulaire. Ainsi, le gène p53 joue un rôle-clé dans l'élimination de cellules présentant des dommages à l'ADN et donc un potentiel accru de transformation maligne[87]. Il a été prouvé qu'environ 50% des lignées cellulaires cancéreuses humaines portaient des mutations sur le gène p53[88, 89]. Des études ont démontré que chez l'humain, l'accumulation de cuivre causait des dommages à l'ADN qui entraînaient l'activation du gène p53, responsable de l'apoptose des cellules hépatiques[90, 91]. Malgré ce potentiel mécanisme de défense contre la transformation des cellules normales en cellules malignes, on observe un risque augmenté de cancers hépatiques chez le rat LEC[92-94], et à un moindre niveau, chez l'humain atteint de la maladie de Wilson[95]. Ceci supporte l'hypothèse que la mutation du gène p53 en altère sa fonction de gardien du génome.

En plus du gène suppresseur tumoral p53, on retrouve également des proto-oncogènes impliqués dans la carcinogenèse hépatique. Les protéines tyrosine-kinase (PTK) de la famille *Src* ont déjà été démontrées comme étant étroitement

associées avec la transformation maligne cellulaire. De cette famille de PTK, la pp60^{c-src} est celle qui a été le plus étudiée en lien avec différentes lignées cellulaires tumorales et tissus tumoraux humains[96]. Le rôle de pp60^{c-src} a été étudié dans le carcinome hépatocellulaire pour la première fois en 1998 par Masaki *et al.*[97]. Il a alors été démontré que l'activité kinase de pp60^{c-src} était significativement plus élevée dans les tissus hépatiques tumoraux et non-tumoraux provenant de foie contenant des carcinomes hépatocellulaires. Ces spécimens étaient prélevés à la foie chez des humains et des rats LEC atteints de carcinomes hépatocellulaires. De plus, l'activité kinase de pp60^{c-src} augmentait aussi en comparant les tissus tumoraux et les tissus non-tumoraux et en comparant les tissus tumoraux non-différenciés et les tissus tumoraux bien différenciés.

Au niveau génomique, il a déjà été démontré que le raccourcissement télomérique était associé aux maladies hépatiques chroniques hyperprolifératives telles que la cirrhose hépatique[98]. Les télomères sont des régions hautement répétitives et non-codantes d'ADN situées aux extrémités des chromosomes. Leur fonction est de protéger le baggage génétique puisqu'à chaque fois qu'un chromosome est dupliqué lors d'une mitose, le complexe enzymatique de l'ADN polymérase s'avère incapable de copier les derniers nucléotides. Quand le télomère devient trop court, il ne joue plus son rôle protecteur. La cellule interprète ceci comme une corruption de son ADN, entre en sénescence et arrête sa croissance. De tels télomères trop raccourcis peuvent aussi provoquer une fusion de deux chromosomes. Comme de telles altérations ne sont pas réparables dans les cellules

somatiques ordinaires, elles peuvent provoquer une apoptose de la cellule[99]. Donc, le raccourcissement des télomères jumelé à la maladie hépatique chronique et son processus régénératif contribuerait à créer l'instabilité génomique nécessaire au processus néoplasique dans le foie[100, 101]. De plus, l'activation des télomérases est retrouvée dans près de 90% des carcinomes hépatocellulaires[102]. Les télomérases sont des enzymes transcriptases inverses qui assurent la synthèse et la croissance des télomères. L'hypothèse actuelle veut que le raccourcissement télomérique apparaisse tôt dans le processus de carcinogenèse hépatique alors que l'activation des télomérases se fait de façon plus tardive[78]. La figure 8 explique les différentes étapes du raccourcissement télomérique qui entraînent l'instabilité génomique et favorisent l'apparition du cancer.

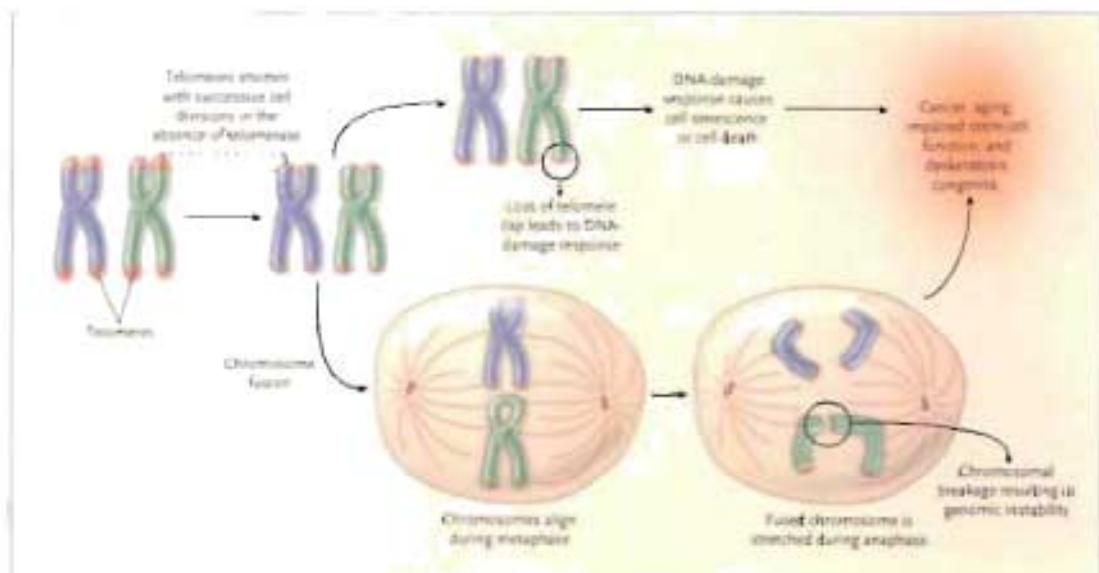


Fig. 8. Les effets du raccourcissement des télomères sur la carcinogenèse hépatique (Tiré de *New England Journal of Medicine* 2006[99]).

Les mécanismes moléculaires quant à l'effet de l'accumulation de cuivre hépatique sur l'apoptose sont encore mal définis, mais une étude *in vitro* a montré que le cuivre possédait l'habileté de déplacer le zinc de son site de liaison sur le gène p53 et ainsi de créer un repliement anormal de la protéine produite par le gène[103]. Le cuivre intra-cellulaire semble également essentiel aux activités d'oxydo-réduction qui sont critiques pour la conformation de la protéine p53 et aux affinités de liaison de l'ADN sur les sites du p53 en permettant sa promotion[104].

Le stress oxydatif dû à la toxicité du cuivre peut causer des dommages à l'ADN directement via le biais des radicaux libres ou indirectement via la peroxydation lipidique dont les produits causeront à leur tour des dommages à l'ADN[105-107]. Il existe des évidences supportant le fait que le stress oxydatif[108, 109] et les produits de la peroxydation lipidique[110] engendreraient des mutations sur le gène p53. La figure 9 résume les différents joueurs du stress oxydatif dans les cellules du corps humain.

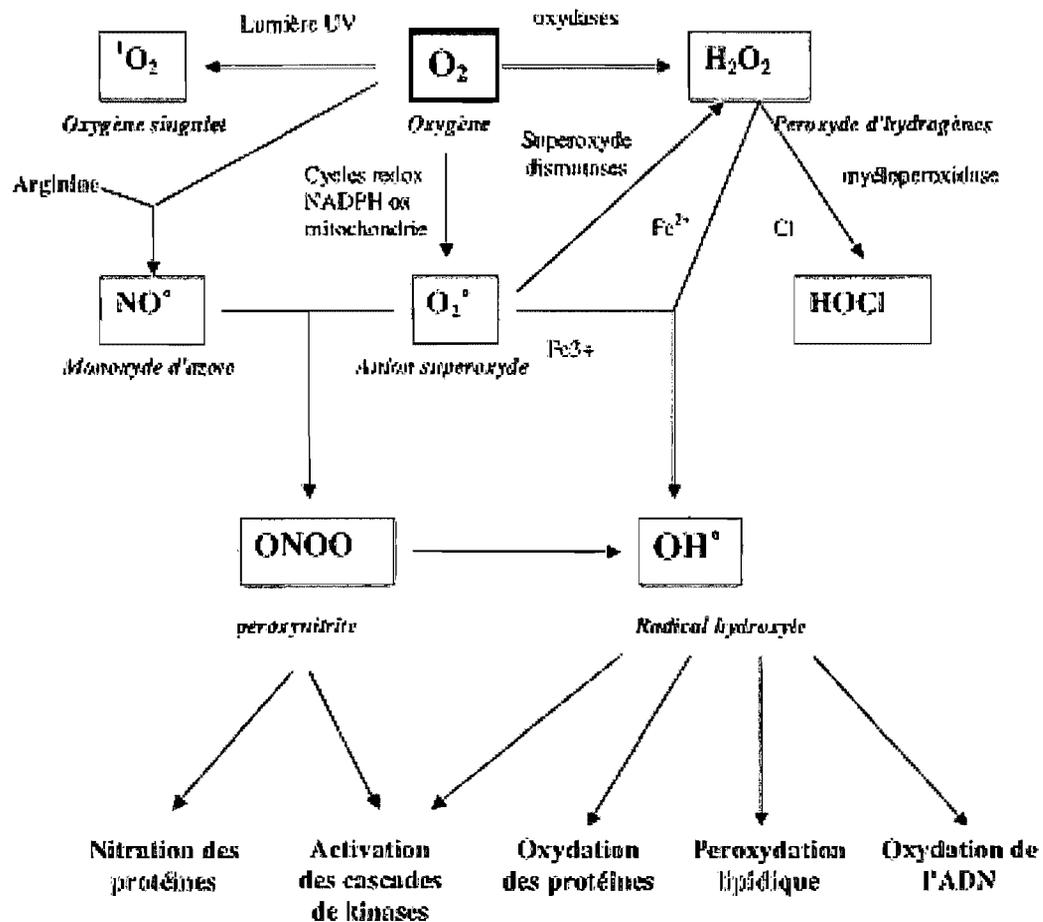


Fig 9. Le stress oxydatif (Tiré de *Actualités Biochimiques* 2003[111]).

Cancer hépatique et maladie de Wilson

Tel que mentionné précédemment, bien qu'il existe un risque théorique, peu de cas de carcinomes hépatocellulaires associés à la maladie de Wilson sont rapportés dans la littérature[95, 112]. Encore moins de cas de cholangiocarcinomes sont rapportés. En date de 1997, seulement 15 cas d'hépatocarcinomes et un cas de cholangiocarcinome en lien avec la maladie de Wilson étaient décrits[95, 113].

Initialement, on avait soulevé l'hypothèse que l'accumulation de cuivre pouvait être protectrice quant au risque de néoplasies pour ces patients[114]. On a rapidement rejeté cette hypothèse et plutôt attribué le faible taux de cancers hépatiques au retrait rapide de l'agent offenseur avec la thérapie chélatrice ou à la mort prématurée des patients non-traités[34]. De plus, le taux de céruloplasmine chez les patients atteints de la maladie de Wilson n'est pas complètement nul, ce qui permet une excrétion minimale de fer et de cuivre. Les patients non-traités se présentent rarement avec un diagnostic de cancer hépatique.

Cancer hépatique et rat LEC

L'évolution chez l'humain diffère grandement de l'évolution clinique du rat LEC non-traité chez lequel on observe un taux de 90% et plus d'hépatocarcinomes à l'âge de 12 mois. On retrouve également une forte prévalence de cholangiocarcinomes chez les rats LEC[92]. La prévalence des hépatocarcinomes et des cholangiocarcinomes a été étudiée par notre groupe sur une cohorte historique de rats LEC non-traités afin de mieux caractériser cette population (données non-publiées) (**fig. 10**).

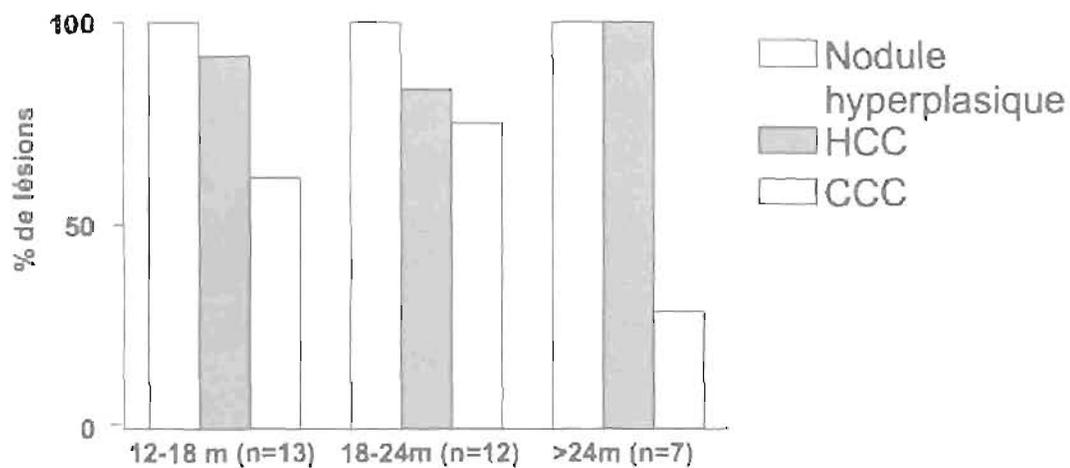


Fig. 10. Taux de nodules hyperplasiques, de carcinomes hépatocellulaires (HCC) et de cholangiocarcinomes (CCC) en fonction de l'âge chez les rats LEC non-traités (données non-publiées).

Le développement de carcinomes hépatocellulaires et de cholangiocarcinomes chez les rats LEC a rapidement été associé à l'accumulation de cuivre au niveau du foie [72, 74]. D'autres études portant sur la carcinogénèse hépatique chez le rat LEC se sont plutôt intéressées à l'accumulation intra-hépatique de fer. Ainsi, dans celle publiée par Kato *et al.* en 1993, la diète sans fer administrée aux rats LEC diminuait le taux de carcinome hépatocellulaire alors que la diète sans cuivre ne montrait pas d'amélioration [115].

Cependant, il pourrait bien exister chez les rats LEC une susceptibilité accrue aux cancers hépatiques qui serait indépendante de l'accumulation intra-hépatique de cuivre ou de fer. Une étude publiée en 1995 par le groupe de Hattori *et al.* démontre cette hypothèse [116]. Des croisements ont été faits entre des rats LEC et

LEA ainsi que des rats LEC et des rats Fisher 344; ces rats étaient appelés F1. Les rats F1 étaient ensuite croisés entre eux. On injectait un agent chimique carcinogénique (diéthylnitrosamine) chez les différents groupes de rats. Bien que les rats de la F1 n'accumulaient pas de cuivre au niveau du foie, on retrouvait un nombre aussi important de foyers tumoraux que chez les rats LEC qui accumulaient du cuivre intra-hépatique. Donc, il pourrait bien y avoir un facteur génétiquement indépendant de l'accumulation intra-hépatique de cuivre qui induit cette susceptibilité au diéthylnitrosamine chez les rats LEC.

Par ailleurs, une étude réalisée sur la souris portant une délétion sur le gène *Atp7b* démontrait le développement de cholangiocarcinomes liés à l'accumulation de cuivre dans le foie de ces souris[117]. Devant autant de preuves d'une susceptibilité accrue au développement de néoplasie hépatiques chez les modèles animaux de la maladie de Wilson, un doute est soulevé quant aux risques que présentent les humains atteints de cette maladie. Une étude rétrospective faite sur 363 patients atteints de la maladie de Wilson et avec un suivi de 10 à 45 ans tend à montrer une augmentation du risque de malignités intra-abdominales et recommande un suivi plus serré de ces patients[95].

La transplantation hépatocytaire

Historique

La transplantation hépatocytaire consiste en l'isolation d'hépatocytes à partir du parenchyme hépatique pour en suite en faire la transplantation sous forme de suspension liquide. Elle a été suggérée comme modalité thérapeutique il y a plus de 30 ans et son utilité est proposée comme curative ou encore comme thérapie temporaire en attendant la transplantation hépatique. On limite son usage aux pathologies dans lesquelles il n'y a pas d'atteinte architecturale du parenchyme hépatique, telles que l'insuffisance hépatique aiguë ou chronique et les maladies métaboliques hépatiques[118, 119]. Il existe plusieurs raisons expliquant l'exploitation d'une telle avenue thérapeutique malgré l'existence d'un traitement curatif avec un bon taux de succès, la transplantation hépatique.

La transplantation hépatique à partir de donneurs cadavériques pose un problème de rationnement. Chaque année, plusieurs personnes meurent d'insuffisance hépatique en attendant leur tour sur la liste d'attente[120]. La transplantation hépatique à partir de donneurs vivants tente de remédier à ce problème, mais il persiste un fort déséquilibre entre la quantité d'organes disponibles et le nombre de patients en attente de transplantation hépatique. Par ailleurs, la transplantation hépatique demeure une intervention chirurgicale majeure comportant des risques de morbidité et mortalité non négligeables. À long terme, les complications

potentielles des agents immunosuppresseurs réduisent bien souvent la qualité de vie des transplantés, sans compter le risque de rejet.

Dans ce contexte, une intervention aussi simple et peu invasive que la transplantation hépatocytaire constitue un traitement de choix. Pourtant, cette modalité thérapeutique n'occupe pas une place majeure dans le traitement de ces conditions, malgré des succès décrits dans la littérature chez les animaux et les humains. Ceci s'explique en partie par le manque d'organes disponibles pour la transplantation hépatique. Tous les organes remplissant les critères requis pour la transplantation sont utilisés à cette fin et il ne reste donc pas de tissus hépatiques disponibles pour d'autres usages[121, 122]. Les organes qui ne remplissent pas les critères de greffe sont pour la plupart des fois stéatosés qui ne sont pas non plus optimaux pour la transplantation hépatocytaire[119].

Plusieurs types de transplantation hépatocytaire sont décrits, soient la transplantation autologue après thérapie génique[93], la transplantation syngénique[123], la transplantation allogénique[124] et la transplantation xénogénique[125]. Il existe aussi plusieurs techniques de transplantation, soient avec une injection en intra-péritonéal[126], avec une injection à travers le parenchyme hépatique[127] ou splénique[128] ou encore avec une injection directement dans la veine porte[129].

Transplantation hépatocytaire chez les modèles animaux

Plusieurs modèles animaux permettent l'étude de la transplantation hépatocytaire. Les modèles animaux de maladies métaboliques hépatiques sont les suivants: le rat Gunn (maladie de Crigler-Najjar type1)[123], la souris *FAH* (tyrosinémie type1)[130], le rat LEC (maladie de Wilson)[127], la souris *mdr2* (cholestase intra-hépatique progressive familiale type 3)[131], la souris *spf-ash* (défiance en orithine transcarbamylase)[132], le lapin Watanabe hyperlipidémique (hypercholestérolémie familiale)[133] et le chien dalmatien hyperuricémique[134]. Il existe aussi des modèles animaux pour la transplantation hépatocytaire dans le contexte d'une insuffisance hépatique aiguë[135] ou chronique[136].

En 1976, Matas *et al.* publiaient la première étude sur la transplantation hépatocytaire en utilisant le modèle animal du rat Gunn[123]. Dans ce modèle de maladie hépatique cholestatique, on observait une diminution de la bilirubine totale sérique après la transplantation d'hépatocytes. Par la suite, de nombreuses autres études utilisant différents modèles animaux et avec différentes techniques de transplantation ont démontré une correction du défaut enzymatique chez les animaux avec des maladies métaboliques, une amélioration de la survie à court terme chez les animaux avec des insuffisances hépatiques aiguës et une amélioration de la fonction hépatique et de la survie chez les rats cirrhotiques.

Le processus d'implantation des hépatocytes transplantés a été étudié par l'équipe de Gupta en 1999[137]. Cette étude a été effectuée sur un modèle animal de rats F344 déficients en dipeptidyl-peptidase IV transplantés directement dans le parenchyme splénique avec des hépatocytes de rats F344 syngéniques. Une partie des hépatocytes transplantés entrent rapidement dans les sinusoides hépatiques, mais environ 70% sont éliminés par les phagocytes et les macrophages avant d'y parvenir. Environ 16 à 20 heures après la transplantation, les hépatocytes passent des sinusoides hépatiques aux plaques hépatiques en brisant l'intégrité de l'endothélium sinusoidal. L'intégration au parenchyme hépatique des hépatocytes transplantés nécessite la reconstitution de la membrane cellulaire et la formation des canaux biliaires. L'implantation des cellules transplantées était prouvée par plusieurs méthodes, par exemple par la production d'albumine chez des rats analbuminémiques[129], par la transplantation d'hépatocytes exprimant un antigène marqueur de surface[138] ou la production d'une enzyme chez des rats possédant un déficit pour cette même enzyme[139].

Ces études ont aussi permis de démontrer qu'un stimulus était nécessaire pour que les hépatocytes transplantés bénéficient d'un avantage prolifératif sur les hépatocytes-hôtes. Ces stimuli peuvent prendre la forme d'un agent toxique tel que la rétroarsine[140] et le tétrachlorure de carbone[141] ou encore une hépatectomie partielle[142]. Quant à la nécessité d'utiliser des agents immunosuppresseurs, les données actuelles ne sont pas claires. Des études ont montré que la transplantation

hépatocytaire syngénique entre espèces de souches très apparentées (par exemple, les rats LEA et LEC), une immunosuppression ne serait pas nécessaire[127, 143].

Transplantation hépatocytaire chez le rat LEC

La première étude portant sur la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC a été faite en 1996 par l'équipe de Yoshida[127]. Les hépatocytes étaient isolés à partir de foies de rats LEA âgés d'un ou deux jours. Des aliquots de 3×10^6 hépatocytes viables étaient ensuite infusés dans la veine mésentérique de rats mâles LEC âgés de 7 semaines et ayant subi une hépatectomie partielle (2/3) juste avant la transplantation. Les constatations étaient une meilleure survie chez les rats LEC transplantés, des dommages hépatiques moindres à l'analyse histologique, une accumulation hépatique de cuivre équivalente à 60% de celle normalement retrouvée chez les rats LEC et l'expression d'ARNm d'*Atp7b* dans le foie des rats LEC transplantés. D'autres études ont ensuite montré des résultats similaires en transplantant des hépatocytes provenant de rats LEA adultes plutôt que néonataux[143, 144]. Toutefois, ces études montraient certaines lacunes puisqu'elles n'incluaient pas de tests des fonction hépatique et affichaient un taux de survie anormalement élevé chez les rats LEC non-transplantés. De plus, l'utilisation de stimuli tels que la rétorsine en addition à l'hépatectomie partielle (2/3) entraînaient une mortalité élevée chez les animaux n'ayant pas un taux suffisant d'implantation des cellules transplantées et est donc difficilement reproductible chez les humains[144].

Quelques années plus tard, notre équipe a travaillé à parfaire une technique de transplantation hépatocytaire chez le rat LEC pour tenter de pallier aux lacunes laissées par les dernières études. Les hépatocytes transplantés étaient isolés à partir de foies de rats LE adultes. Un aliquot de 1×10^7 hépatocytes était injecté dans le parenchyme splénique de rats LEC mâles et femelles âgés de 8 semaines. Simultanément à la transplantation cellulaire, les rats LEC subissaient une hépatectomie partielle (1/3). En raison de l'absence de littérature concluante sur le sujet de l'immunosuppression et pour étendre la portée de notre étude aux humains, les rats LEC transplantés recevaient une injection intra-péritonéale de Tacrolimus quotidiennement.

Une première étude issue de ces travaux a été publiée par notre groupe en 2006[145]. L'objectif était d'étudier les effets potentiels de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC à court terme. À 6 mois, les rats étaient sacrifiés afin de procéder aux différentes analyses. Les tests de fonction hépatique (AST, ALT, bilirubine totale) étaient similaires dans les 3 groupes, soient les rats LEC transplantés et hépatectomisés, les rats LEC hépatectomisés seulement et les rats LEC non-traités. La survie à 6 mois chez les rats LEC transplantés était de 97% contrairement à 63% chez les rats LEC ayant subi une hépatectomie partielle seule. Tous les rats LEC transplantés ont montré une excrétion biliaire de cuivre accrue, une accumulation hépatique de fer moindre et une activité de la céruloplasmine oxydase augmentée. Les rats LEC transplantés qui exprimaient l'ARNm de l'*Atp7b* (7 rats sur un total de 12 rats) montraient également une accumulation hépatique

de cuivre significativement inférieure à celle observée chez les rats LEC non-traités. À l'histologie, les foies transplantés présentaient des îlots péri-portaux d'hépatocytes normaux qui montraient la présence d'ATP7B à l'immunohistochimie.

Transplantation hépatocytaire chez les humains

Bien qu'il y ait beaucoup plus d'études portant sur la transplantation hépatocytaire faites sur les animaux, il en existe tout de même quelques unes faites chez les humains. La première étude sur le sujet a été réalisée en 1992 par l'équipe de Mito[146]. Cette étude rapportait les données d'une petite série de patients atteints d'insuffisance hépatique chronique qui ont reçu une transplantation hépatocytaire autologue provenant de spécimens d'hépatectomies partielles faites précédemment. Malgré le fait que des hépatocytes pouvaient être détectés dans la rate (site de la transplantation) de ces patients jusqu'à un an plus tard, aucun bénéfice n'a été rapporté dans cette étude. D'autres patients atteints d'insuffisance hépatique chronique et ayant subi une transplantation hépatocytaire ont été rapportés dans une revue de la littérature faite par le groupe de Strom en 1999, mais aucune conclusion quant au bénéfice réel de cette procédure ne peut être tirée[147].

La transplantation hépatocytaire chez l'homme a aussi été tentée dans le contexte d'insuffisance hépatique aiguë grave. En 1994, une étude faite en Inde par le

groupe de Habibullah rapporte l'expérience de 7 patients atteints d'hépatites fulminantes s'accompagnant d'encéphalopathies avancées ayant subi une transplantation d'hépatocytes provenant de foetus humains[126]. Ces patients étaient comparés à un groupe-contrôle de patients atteints d'hépatites fulminantes n'ayant pas consenti à la transplantation hépatocytaire. Bien qu'un certain bénéfice soit observé, des conclusions claires ne peuvent être tirées à cause du manque de données sur les patients du groupe-contrôle. D'autres patients ont par la suite été rapportés dans la littérature, mais toujours à cause de la nature même de la maladie qui rend l'évaluation objective difficile, les conclusions manquent de rigueur scientifique[147]. Malgré des tendances observées qui semblent indiquer que la transplantation hépatocytaire pourrait être bénéfique chez les patients atteints d'insuffisance hépatique aiguë et chronique, ils ne s'agit pas de bons modèles pour démontrer hors de tout doute son efficacité.

D'autres groupes de chercheurs se sont donc plutôt tournés vers la transplantation hépatocytaire dans le contexte de maladies métaboliques hépatiques qui permettent l'utilisation de marqueurs objectifs. En 1995, Grossman *et al.* rapportent les cas de 4 patients pédiatriques atteints d'hypercholestérolémie familiale ayant reçu une transplantation hépatocytaire autologue après avoir subi une hépatectomie partielle et que ces mêmes hépatocytes aient été transfectés *in vitro* avec un vecteur rétroviral portant le gène du récepteur LDL[148]. Ce même groupe de chercheurs avaient vérifié préalablement la faisabilité et l'efficacité de cette procédure chez les lapins Watanabe en 1991[93]. Bien qu'une expression du transgène était

trouvée jusqu'à 4 mois après la transplantation, l'amélioration inconstante et sous-optimale des fonctions métaboliques chez les patients a été expliquée par un nombre insuffisant de cellules transplantées et/ou implantées.

Par la suite, des cas isolés de transplantation hépatocytaire autologue ont été rapportés dans la littérature. Une patiente avec la maladie de Crigler-Najjar type 1 a été transplantée et a ensuite montré une amélioration clinique et biochimique significative[149]. Étant donné que l'amélioration demeurait tout de même sous-optimale, elle a ensuite subi une greffe hépatique cadavérique avec succès. Deux patients avec une déficience en ornithine transcarbamylase (OTC) ont montré une amélioration clinique et biochimique, mais seulement de façon temporaire. L'un de ces patients est décédé d'hyperammoniémie 52 jours après la transplantation cellulaire[150] et le second a subi une greffe hépatique[151]. Un patient adulte avec un déficit de storage du glycogène type 1a a montré une amélioration du contrôle glycémique suite à la transplantation cellulaire malgré que l'implantation des hépatocytes n'a pu être démontrée à la biopsie hépatique[152]. Un patient pédiatrique atteint de la maladie de Refsum a montré une amélioration biochimique suite à la transplantation[153].

Il est évident qu'un bénéfice est reconnu suite à la transplantation hépatocytaire. Toutefois, le problème actuel réside dans le fait que ces bénéfices sont temporaires et parfois insuffisants pour entraîner une amélioration clinique satisfaisante. Ceci pourrait être expliqué par le faible taux de repopulation des hépatocytes

transplantés comparativement à celui observé chez les modèles animaux[154, 155]. Contrairement aux animaux, les humains ne bénéficiaient pas de stimuli aussi puissants permettant l'avantage prolifératif des hépatocytes transplantés, tels que la rétrovirus ou l'irradiation. L'utilisation de l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) en tant que stimulus de prolifération est un outil prometteur qui pourrait être utilisé chez l'humain de façon plus sécuritaire[156]. La transplantation hépatocytaire chez les humains doit être étudiée davantage.

Hypothèses et objectifs de l'étude

Le rat LEC est un excellent modèle animal de la maladie de Wilson pour l'étude de l'hépatite fulminante et de l'hépatite chronique. Bien qu'à l'heure actuelle, peu de cas d'hépatocarcinomes et de cholangiocarcinomes soient répertoriés chez les patients atteints de la maladie de Wilson, le rat LEC constitue un modèle de choix pour l'étude de ces deux conditions étant donné leur incidence importante chez cette population. La maladie de Wilson fait partie de la catégorie des maladies hépatiques métaboliques et la plupart de ces pathologies, telles que l'hémochromatose et la déficience en α 1-anti-trypsine, entraînent un risque fortement accru de développer un cancer hépatique[157, 158].

On peut donc penser que l'étude de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC dans le contexte de prévention de la carcinogenèse hépatique pourrait engendrer des résultats qui seraient extrapolés à l'ensemble des maladies hépatiques métaboliques.

Après le succès rencontré par notre équipe avec l'étude de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC dans le contexte de l'hépatite aiguë, nous avons jugé pertinent d'utiliser le même protocole afin de démontrer les effets à long terme de la transplantation sur le développement de l'hépatite chronique, la cirrhose, l'hépatocarcinome et le cholangiocarcinome.

Notre hypothèse de travail était donc que la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC pouvait diminuer l'incidence de ces cancers hépatiques. Cette hypothèse part de la prémisse que la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC favorise l'excrétion biliaire de cuivre, augmente l'activité de la céruloplasmine oxidase et diminue l'accumulation intra-hépatique de fer et de cuivre. Tel que déjà discuté, l'inflammation chronique due à la toxicité hépatique du cuivre est jugée responsable de la transformation des cellules saines en cellules néoplasiques[81, 85].

Nos objectifs étaient de démontrer l'implantation des hépatocytes transplantés à long terme (12 mois), de montrer une diminution de l'incidence d'hépatocarcinomes et de cholangiocarcinomes chez les rats LEC transplantés ainsi qu'une diminution histologique de l'inflammation, la fibrose et autres changements associés à l'hépatite chronique.

À l'heure actuelle et à notre connaissance, aucune étude ne démontre les bénéfices potentiels de la transplantation hépatocytaire sur la carcinogénèse hépatique dans le contexte des maladies hépatiques métaboliques.

ARTICLE

**Long-term results of hepatocyte transplantation
in Long-Evans Cinnamon rats**

Marianne Beaudin¹, Seon Mee Park² Alexis-Simon Cloutier¹, Pierre Brochu³,
Fernando Alvarez², Steven R. Martin², Michel Lallier¹.

Department of Surgery¹, Department of Pediatrics², Department of Pathology³,
Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Correspondence to: Dr Michel Lallier, Department of Surgery

Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada,

H3T 1C5

Tel: [information retirée /
information withdrawn]

E mail: [information retirée / information withdrawn]

Introduction: The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is an animal model of Wilson's disease, an autosomal recessive inherited disorder caused by a mutation in the *ATP7B* gene. These rats bear a large C-terminal deletion in the rat homologue, the *Atp7b* gene and suffer spontaneous hepatitis that, in the survivors, evolves to chronic hepatitis and eventually, hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocellular carcinoma (CCC). Hepatocyte transplantation (HT) in LEC rats was performed to evaluate whether it can prevent the development of liver tumor.

Methods: LEC-HT rats (n=20) received 1/3 partial hepatectomy and HT from donor Long-Evans rats at 8 weeks of age. Immunosuppression was maintained with intra-peritoneal injections of Tacrolimus for 12 months. Control LEC rats (n=12) received only 1/3 partial hepatectomy. At 18 months of age, rats were sacrificed and liver was harvested for histology, donor cell engraftment by immunostaining for ATP7B and RT-PCR for *Atp7b* mRNA. Pre-neoplastic lesions of HCC were confirmed by immunostaining for GST- π .

Results: Both HT rats and non-HT controls recovered from acute hepatitis, but showed persistent elevation of serum aminotransferases until sacrifice at 18 months of age. The survival before sacrifice was similar in both groups. Fewer HT rats developed HCC than controls (5% vs. 42%). All controls but one developed CCC (92%), whereas 13 out of 20 HT rats developed CCC (65%). Liver tissue expressed low levels of *Atp7b* mRNA ($1.9 \pm 0.6\%$) in 4 out of 15 HT rats. All 4 rats expressing detectable *Atp7b* mRNA developed only hyperplastic nodules. ATP7B-positive foci confirmed by immunohistochemistry were observed in these 4 rats. All rats showed GST- π positive nodules, cholangiolar proliferation and fibrosis in non-tumoral tissues.

Conclusions: HT, even at low repopulation rates, may delay the development of liver tumors in LEC rats. The presence of pre-neoplastic lesions in non-tumoral tissues suggests that development of liver tumors could not be completely prevented. Studies using strategies to increase donor cell engraftment are needed.

Key words: Hepatocyte transplantation, LEC rat, Hepatocellular carcinoma, Cholangiocellular carcinoma.

INTRODUCTION

Wilson's disease is a metabolic liver disease characterized by a defect in copper incorporation into ceruloplasmin leading to a lack of excretion of hepatic copper and iron in the bile. As a result, copper accumulates in several organs including liver, kidneys, eyes and brain. The most common clinical manifestations include acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, neurologic and psychiatric symptoms.

The Long-Evans Cinnamon (LEC) rat is an animal model of human Wilson's disease. It bears a 900bp deletion in the C-terminal portion of the *Atp7b* gene[159]. LEC rats exhibit low plasma ceruloplasmin oxidase activity and reduced biliary copper excretion associated with liver retention of copper and iron. Approximately 40% of these rats die from a fulminant hepatitis between 16 and 20 weeks of age[160]. The surviving rats progress to chronic hepatitis with hyperplastic foci evolving to hyperplastic nodules and eventually, hepatocellular carcinomas[161, 162]. The surrounding liver parenchyma often exhibits cholangiolar proliferation and fibrosis. Many of these rats also develop cholangiolar carcinomas[161, 162]. In addition to being a good animal model of Wilson's disease, LEC rats are also very useful for studying the effects of chronic liver inflammation associated with iron and copper storage on carcinogenesis[73, 74, 160, 163].

Hepatocyte transplantation has the potential to support patients with acute, fulminant liver failure and to improve hepatic function for those with chronic liver

failure. This has been shown in many previous studies in animals[143, 145, 164] and in a small number involving humans[147, 149, 165]. It has been shown that LEC rats treated with HT showed reduced risk factors for malignant transformation. Lower copper and iron contents in the liver will reduce lipid peroxidation and also reduce the number of pre-neoplastic lesions such as hepatocyte dysplasia, cholangiolar proliferation or fibrosis[166]. Two previous studies failed to show that HT could also reduce the number of neoplastic lesions because their rat colonies never developed hepatic tumors[143, 167].

Thus, our objective was to study the effect of HT on the appearance of liver tumors in a colony of LEC rats that have proven to develop hepatic cancer in the past. Our hypothesis was that HT can prevent the development of liver cancer in an animal model of Wilson's disease.

MATERIALS AND METHODS

Animal selection and care

We established a colony of LEC rats (Charles River, Yokohama, Kanagawa, Japan) in 1996 to pursue studies of Wilson's disease and therapy of metabolic liver diseases. In the first few years, the colony was troubled by high neonatal mortality, low female fertility, difficulty carrying their pregnancy to term and poor mothering behaviour. A stronger offspring was produced by crossing non-mutant parental

strain Long-Evans (LE) rats (Charles Rivers, St-Constant, Québec, Canada) with our LEC rats and then backcrossing the offspring (LE x LEC) to LEC rats.

We selected LEC homozygotes by genotyping at 6 weeks of age, using the tip of the tail for tissue sampling. The primers and PCR conditions for genotyping were as follows. PE21 5'-GGC ATG ACT TGT CAT TCT TG-3' (forward) and PE22 5'-GAT CTT GCC TTC GAT GGA G-3' (reverse) were used to amplify a 300 nucleotides sequence of exon 2 present in all rats. PE181 5'-GGC ATC AAC AAA GTC TTT GC-3' (forward) and PE182 5'-CTT ATA AGG ACC ACG TCG G-3' (reverse) were used to amplify a 200 nucleotide sequence of exon 18 which lies within the deleted ones in LEC rats and is therefore only present in normal LE rats. PCR involved 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 54°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. After PCR and electrophoresis on 1.5% agarose gel, a single band identified homozygotes while a second band identified heterozygotes. In this study, we divided the LEC rats in two different groups: 20 LEC rats (M:F;14:6) underwent 1/3 partial hepatectomy and hepatocyte transplantation at 8 weeks of age and 12 control LEC rats (M:F;7:5) underwent 1/3 partial hepatectomy only at 8 weeks of age.

Rats were maintained in the animal care facilities at Sainte-Justine Hospital Research Center under 12-hour light/dark cycle and were fed with standard rat chow and tap water *ad libitum*. The animal care and treatment respected the

guidelines outlined in the NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (revised 1985) prepared by the National Academy of Sciences.

Hepatocyte isolation and transplantation

Hepatocyte isolation and transplantation was performed as previously described[145]. Briefly, hepatocytes were isolated from LE rats according to a standard two-step collagenase perfusion technique (Worthington Biochemical, Lakewood, NY, USA)[168]. The preparation was used for transplantation when more than 95% of the isolated cell fraction was identified as hepatocytes by morphological analysis and more than 85% of these cells were viable by trypan blue dye exclusion analysis (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA). Hepatocytes (1×10^7) suspended in 100 μ l RPMI (Gibco BRL, Ontario, Canada) were injected directly into the splenic pulp at the same time of 1/3 partial hepatectomy. In the LEC-HT group, immunosuppression was maintained for 12 months with daily intra-peritoneal injections of Tacrolimus (Fujisawa, Canada) at the dose of 0.02mg/kg/d.

Blood samples and body weight were checked weekly after operation. Survival of animals was followed for 18 months for long-term analysis. At the time of sacrifice, rats were anesthetized with isoflurane (Abbott, Québec, Canada) and the main bile duct was cannulated with polyethylene tubing (Becton-Dickinson, Ontario, Canada). One ml of bile protected from light was collected into a vial on

ice. After bile collection, the liver was harvested and grossly normal and tumor tissues were collected separately. Half of each sample was put in 10% formalin for histological examination and the other half was stored at -80°C for further analysis.

Measurements of copper and iron

Liver was initially digested with nitric and perchloric acid (2.5:1, v/v). Liver and bile were analyzed for copper concentration by atomic absorption spectrophotometry (Thermo Instruments, Mississauga, Ontario, Canada)[169]. The copper and iron concentrations were expressed as $\mu\text{mol/l}$ for bile and $\mu\text{mol/g}$ of dry weight for liver. The copper and iron concentrations were also measured for tumoral tissues as well as non-tumoral tissues.

Ceruloplasmin oxidase activity

The enzymatic activity of ceruloplasmin was measured using *O*-dianisidine dihydrochloride as a substrate[170]. 75 μL of buffer was added to 5 μL of serum. After 5 minutes, 20 μL of *O*-dianisidine dihydrochloride (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) was added at a temperature of 30°C. The reaction was stopped by acidification by adding 150 μL of sulfuric acid (Seaster Chemicals, Pittsburgh, PA, USA) at 5 minutes and 15 minutes. A stable purplish-red solution was formed which absorbed maximally 540 nm. The levels of ceruloplasmin oxidase activity

were obtained with the following formula: $(A_{15}-A_5) \times 6.25 \times 10^{-1}$ U/mL, where A_{15} and A_5 are the measured absorbance of the 15 minutes and 5 minutes solutions. All tests were run in triplicates and expressed as a mean value.

RT-PCR of liver tissue

RT-PCR for *Atp7b* gene was performed separately on tumoral and non-tumoral liver tissue. Total RNA was extracted with Trizol (Gibco BRL, Ontario, Canada). RNA was reverse transcribed at 37°C for 1 hour with reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). PCR conditions were defined with primers amplifying a 380bp segment nucleotide from 3460 to 3840 in the 3' region of the *Atp7b* gene that is deleted in LEC rats. The primers were 5'-CCA TCT CCA GTG ACA TCA G-3' (forward) and 5'-AGT CCC AAT AGC AAT GCC-3' (reverse). 200bp β -actin was amplified as internal control using 5'-AGG CAT ACA GGG ACA ACA C-3' (forward) and 5'-GGA GAA GTT TGG CAC CAC-3' (reverse). PCR involved 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 60°C for 1 minute an extension at 72°C for 2 minutes. Separation, detection and quantification of PCR products were accomplished using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)[171]. The repopulation rate of transplanted hepatocytes was expressed as a percentage of LE rat liver.

Light microscopy and immunohistochemistry

Liver lobes were excised and cut into 5mm-thick slices. One slice per lobe from tumoral and non-tumoral areas were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin, cut into 5 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin (H & E). The sections were reviewed for hepatocellular carcinoma, cholangiocellular carcinoma or fibrosis, pre-neoplastic lesions (dysplastic foci or dysplastic nodules)[172] by a pathologist blinded to the treatment group. For early detection of malignant transformation, liver sections were stained for glutathione-S-transferase- π (GST- π) protein using polyclonal antibody (1:100, DAKO)[173].

For evaluating the presence of engrafted cells, immunohistochemistry for ATP7B protein was performed. Liver embedded in Tissue-Tek (Miles, Elkhart, IN, USA) was cut 5 μ m-thick in a cryostat and stained with anti-ATP7B polyclonal antibody[145] and anti-GST- π polyclonal antibody (MBL, Nagoya, Japan). Sections were fixed with mixtures of acetone and methanol (3:1, v/v) (Seaster Chemicals, Pittsburgh, PA, USA) under -20°C for 20 minutes, incubated with 3% bovine serum albumin (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) in PBS at room temperature for 30 minutes to prevent non-specific binding. Sections were sequentially incubated with primary antibody (1:100 for ATP7B and 1:500 for GST- π , 4°C, left overnight), with rabbit anti-goat IgG FITC antibodies (1:1000, room temperature, 30 min) (Biosource International, Camarillo, CA, USA), with

anti-rabbit HRP conjugates and then were treated with DAB (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA).

RESULTS

Clinical and biochemical course

Weight, serum AST, ALT and total bilirubin levels were similar between the transplanted and the control groups. One LEC-HT rat and 2 LEC-non-HT rats died at 3-4 months of age due to fulminant hepatitis. The rats that recovered from acute hepatitis showed persistent elevation of serum transaminases until 18 months of age. One rat of each group died at 16 and 18 months of age due to liver tumor. Three LEC-HT rats died of causes other than liver disease: bowel strangulation due to inguinal hernia, trauma during blood sampling and unknown cause (**Table 1**). A Kaplan-Meier survival curve could not be calculated because very few rats died from something other than the sacrifice at 18 months. In the LEC-HT group, only 5 rats died before 18 months (25%) while only 3 rats died before 18 months (25%) in the control group.

Development of pre-neoplastic and neoplastic lesions

HCC developed less frequently in HT rats than in non-HT controls (5% vs. 42%, $p=0.018$) (**Fig. 1**). HCC were characterized by well differentiated, multi-focal,

small tumors (<1cm in long diameter). All of the control rats except one (92%) developed CCC, whereas 13 out of 20 (65%) among the LEC-HT rats developed CCC ($p=0.2$) (**Fig. 2**). Cholangiocellular carcinoma were characterized by small multiple nodules with severe cholangiolar fibrosis and proliferation. All of the rats showed GST- π positive nodules, cholangiolar proliferation and fibrosis in non-tumoral tissues (**Fig. 3**).

RT-PCR of liver tissue

At 18 months, liver tissue expressed *Atp7b* mRNA in 4 out of 15 HT rats (1.9 \pm 0.6% in percentage of LE rat liver). (**Fig. 4**) All of these rat livers showed ATP7B-positive foci by immunostaining (**Fig. 5**). None of these 4 rats developed HCC or CCC, but dysplastic foci were identified in 3 cases and dysplastic nodules in one case.

Measurements of copper and iron in liver and bile

To evaluate the changes in copper transport in LEC-HT rats ($n=15$), copper levels in bile and liver were compared to control LEC rats ($n=9$) at the time of sacrifice at 18 months. The copper and iron levels in the liver of LEC-HT rats were $12.6 \pm 3.6 \mu\text{mol/g}$ and $22.1 \pm 7.1 \mu\text{mol/g}$ respectively (tumoral and non-tumoral tissues combined). These values were similar to the copper and iron levels found in the liver of control LEC rats, which were $11.0 \pm 2.3 \mu\text{mol/g}$ and $19.6 \pm 8.0 \mu\text{mol/g}$

respectively. The copper and iron levels in the bile of LEC-HT rats were $7.9\pm 4.5\mu\text{mol/L}$ and $19.4\pm 2.9\mu\text{mol/L}$ respectively compared with $6.4\pm 4.8\mu\text{mol/L}$ and $7.8\pm 6.6\mu\text{mol/L}$ respectively in control LEC rats (not statistically significant) (**Table 2**). The levels of copper in tumoral tissue were lower than in non-tumoral tissue ($6.6\pm 3.7\mu\text{mol/g}$ vs. $11.7\pm 2.7\mu\text{mol/g}$ in LEC-HT rats). The levels of iron were similar in tumoral and non-tumoral parts of the liver ($20.5\pm 7.2\mu\text{mol/g}$ vs. $21.1\pm 6.3\mu\text{mol/g}$ in LEC-HT rats).

Ceruloplasmin oxidase activity

Ceruloplasmin oxidase activity, which depends upon the copper transporting function of ATP7B, was compared before and after hepatocyte transplantation in LEC-HT rats (n=15). The activity post-transplantation ($14.7\pm 21.5\text{U/L}$) significantly increased compared with the activity pre-transplantation ($4.4\pm 8.9\text{U/L}$) ($p<0.0001$). However, this value was still under the value observed in heterozygote LEC rats (**Fig. 6**).

DISCUSSION

In this study, we investigated whether hepatocyte transplantation in the LEC rat, an animal model of Wilson's disease, could prevent the development of hepatocellular and cholangiocellular carcinomas. Hepatocyte transplantation in the LEC rat may prevent fulminant hepatitis, reduce chronic inflammation and

improve short-term survival and hepatic function[127, 167]. We previously showed in LEC rats that survival at 6 months was 97% in LEC-HT rats compared with 63% in control rats. At 6 months, 7 out of 12 LEC-HT rats had a positive RT-PCR for *Atp7b* mRNA ($11.9 \pm 13.6\%$ as a percentage of LE rat liver)[145]. As long-term survival in LEC rats is influenced by the development of chronic hepatitis and subsequently hepatic tumors, we wished to investigate the potential beneficial effects of hepatocyte transplantation on these pathological conditions.

Our results showed that the development of hepatocellular carcinoma was significantly lower in the transplanted group. We also observed a tendency toward a lower rate of cholangiocarcinoma in the transplanted group. However, pre-neoplastic lesions could be found in the liver of all rats as confirmed by GST- π immunostaining and cholangiofibrosis[173]. Although pre-neoplastic lesions could be found in the liver of the 4 rats that exhibited cellular engraftment by positive *Atp7b* mRNA, no cholangiocellular carcinoma or overt hepatocellular carcinoma was detected in these rats. This suggests that proper engraftment of hepatocytes may partially prevent or delay the development of liver tumors.

We hypothesized that transplanted hepatocytes should preferentially repopulate the recipient liver because host hepatocyte proliferation in response to the growth stimulus of a partial hepatectomy is attenuated due to the excessive copper accumulation. However, a lower engraftment rate than expected was observed in the liver of the LEC-HT rats at 18 months as measured by immunostaining for

ATP7B and RT-PCR for *Atp7b* mRNA. One explanation may be due to loss of engrafted cells over time possibly accelerated as a direct result of stopping Tacrolimus at 12 months. Indeed our previous short-term study demonstrated higher repopulation rates, maybe due to the continuous use of Tacrolimus[145]. However, against this argument is that syngenic hepatocyte transplantation (between LE, LEA and LEC rats for example) was successful in previous studies even without immunosuppression[127, 143, 167]. Alternatively, RT-PCR and immunostaining may not be able to show the real extent of cell engraftment since cell engraftment, just like copper accumulation[174], could be unevenly distributed within the liver. Supporting the concept that the engraftment rate might actually be higher than shown with immunostaining and RT-PCR is the enhanced level of ceruloplasmin oxidase activity in all the LEC-HT rats post-transplantation while only 4 out of the 15 LEC-HT rats showed *Atp7b* mRNA on RT-PCR.

Copper plays an important role in DNA damage through generation of reactive oxygen species and mutations to the p53 gene which is responsible for cell cycle arrest and apoptosis[90, 175, 176]. We suggest that copper accumulation in Wilson's disease is the initiator of hepatic carcinogenesis as suggested by studies in which copper chelating drugs were able to prevent the development of hepatic tumors in LEC rats[73, 74].

Iron also plays an important role in the development of hepatic tumors in LEC rats. LEC rats have a deficiency in ceruloplasmin oxidase activity which is required for

iron metabolism. Involvement of this protein in iron transport is suggested by its potent ferroxidase activity that catalyzes conversion of Fe^{2+} to Fe^{3+} . This reaction is essential for iron transport across the cell membrane. Thus, iron accumulation is also a usual finding in LEC rats as well as in humans with Wilson's disease[177, 178]. In addition to copper, abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats may be important for the development of liver damage[115, 179]. Our results showed similar levels of iron in the liver of LEC-HT rats and control LEC rats as well as in tumoral and non-tumoral parts of the liver. Although not statistically significant, there was a tendency toward a higher level of iron in the bile of the LEC-HT rats. Despite the fact that the main route of hepatic iron elimination is through the oxidation of iron by ceruloplasmin that allows transport by transferrin in the blood, we believe LEC-HT rats may excrete more iron in bile compared with controls, possibly related to higher ceruloplasmin oxidase activity. We suggest that both copper and iron play a role in hepatic injury, but that copper has a major role in the selective growth of pre-neoplastic and neoplastic cells. Further studies on the role of copper and iron in this disease are needed.

Some bias could have been introduced in our study by the fact that our LEC rat colony was evolving since 1996. When we first started the colony, we established an historical control group composed of 111 LEC rats[145]. These animals presented the same characteristics described by the Japanese group who first published on LEC rats[68]. They had similar rates of acute hepatitis, hepatic tumors and survival at 6, 12 and 18 months. However, several years later, we

observe that at 18 months, 92% of LEC rats had CCC while 42% had HCC. The percentage of HCC in LEC rats at 18 months is somehow lower than originally described. This raises the question of a possible natural selection or appearance of a new mutation among our LEC rats colony.

Another bias in our study is the fact that only the LEC-HT group received Tacrolimus. Some previous studies have shown that Tacrolimus could inhibit the growth of hepatic neoplastic cells *in vitro*[180, 181]. Furthermore, Tacrolimus injections were discontinued at 12 months in LEC-HT rats due to logistic reasons. The fact that LEC-HT rats were without immunosuppression between 12 and 18 months could have had an impact on the incidence of hepatic cancers and on cell engraftment.

We conclude that hepatocyte transplantation in LEC rat model of Wilson's disease may delay the development of liver tumors, even at low repopulation rates. However, the presence of pre-neoplastic lesions in all transplanted rats confirms that hepatocyte transplantation in our study only delayed rather than prevented carcinogenesis associated with accumulation of copper and iron. We believe this is in part due to the low engraftment rate of transplanted hepatocytes at 18 months. Further studies are required to determine whether enhanced transplanted hepatocyte engraftment rates can reduce further the formation of pre-neoplastic cells and subsequently the development of hepatic tumors.

REFERENCES

1. Wu J, F.J., Chen HS, Cox DW, *The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene*. Nature Genetics, 1994. **7**: p. 541-545.
2. Mori M, H.A., Sawaki M, Tsuzuki N, Sawada N, Oyamada M, Sugawara N, Enomoto K, *The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer and much more*. American Journal of Pathology, 1994. **144**: p. 200-204.
3. Miyoshi E, F.J., Hayashi N, Taniguchi N, *LEC rats: an overview of the recent findings*. Journal of Trace Elementary Exploratory Medicine, 1997. **10**: p. 135-145.
4. Schilsky ML, Q.N., Volenberg I, Kabishcher V, Sternlieb I, *Spontaneous cholangiofibrosis in Long-Evans Cinnamon rats: a rodent model for Wilson's disease*. Laboratory Animal Science, 1998. **48**: p. 156-161.
5. Sone K, M.M., Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, Sugimura T, Nagao M, *Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans Cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride*. Hepatology, 1996. **23**: p. 764-770.
6. Jong-Hon K, T.Y., Kasai H, Hosokawa M, Takeichi N, *Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine*. Hepatology, 1993. **18**: p. 614-620.
7. Masuda R, M.Y., Motomichi S, Kimimaro D, Mori M, *High susceptibility to spontaneous development of hepatocellular carcinoma in LEC rats*. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer, ed. Y.M. Mori M, Takeichi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.
8. Grompe M, *Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases*. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 2001. **24**: p. 231-244.
9. Park SM, V.K., Lallier M, Cloutier AS, Brochu P, Alvarez F, Martin SR, *Hepatocyte transplantation in the long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease*. Cell Transplantation, 2006. **15**: p. 13-22.
10. Malhi H, I.A., Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S, *Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease*. Gastroenterology, 2002. **122**: p. 438-447.
11. Fox IJ, C.J., Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC, *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type 1 with hepatocyte transplantation*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**: p. 1422-1426.
12. Strom SC, F.R., Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP, *Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure*. Transplantation, 1997. **63**: p. 559-569.

13. Strom SC, C.J., Fox IJ, *Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease*. Seminars in Liver Disease, 1999. **19**: p. 39-48.
14. Kato J, K.M., Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamaki S, Sawada N, Niitsu Y, *Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats*. Journal of Clinical Investigator, 1996. **98**: p. 923-929.
15. Irani AN, M.H., Slehria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S, *Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease*. Molecular Therapy, 2001. **3**: p. 302-309.
16. Tong JZ, S.S., Cassio D, Gauthier F, Alvarez F, *Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation*. Biology of the Cell, 1994. **81**: p. 77-81.
17. Schilsky ML, S.R., Sterlieb I, *Copper metabolism in the LEC rats, a rodent model of Wilson's disease*. American Journal of Physiology, 1994. **266**: p. G907-G913.
18. Schosinsky KH, L.H., Beeler MF, *Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride*. Clinical Chemistry, 1974. **20**: p. 1556-1563.
19. Gottwald E, M.O., Polten A, *Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100*. Electrophoresis, 2001. **22**: p. 4016-4022.
20. International Working Party, *Terminology of nodular hepatocellular lesions*. Hepatology, 1995. **22**: p. 983-993.
21. Oyamada M, D.K., Fujimoto Y, Takahashi H, Satoh MI, Mori M, Masuda R, Yoshida MC, Satoh K, Sato K, *Spontaneous occurrence of placental glutathione S-transferase-positive foci in the livers of LEC rats*. Japanese Journal of Cancer Research, 1988. **79**: p. 5-8.
22. Yoshida Y, T.Y., Lee GH, Ogawa K, *Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans Cinnamon rats*. Gastroenterology, 1996. **111**: p. 1654-1660.
23. Faa G, N.V., Demelia L, *Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease*. Journal of Hepatology, 1995. **22**: p. 303-308.
24. Hayashi M, K.T., Endoh D, Nakayama K, Arikawa J, Takazawa A, Okui T, *Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **276**: p. 174-178.
25. Tassabehji NM, V.J., Levenson CW, *Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human HepG2 cells*. Experimental Biology and Medicine (Maywood), 2005. **230**: p. 699-708.
26. Narayanan VS, F.C., Levenson CW, *Tumor suppressor protein p53 mRNA and sub-cellular localization are altered by changes in cellular copper in human HepG2 cells*. Journal of Nutrition, 2001. **131**: p. 1427-1432.
27. Harris ZL, G.J., *Genetic and molecular basis for copper toxicity*. American Journal of Clinical Nutrition, 1996. **63**: p. 836S-841S.

28. Shiono Y, H.H., Wakusawa S, Yano M, *Ultrastructural identification of iron and copper accumulation in the liver of a male patient with Wilson disease*. Medical Electron Microscopy, 2001. **34**: p. 54-60.
29. Kato J, K.Y., Sugawara N, Katsuki S, Shintani N, Fujikawa K, Miyazaki E, Kobune M, Takeichi N, Miitsu Y, *Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats*. Japanese Journal of Cancer Research, 1993. **84**: p. 219-222.
30. Ma Y, Z.D., Zawabata T, Kiriu T, Toyokuni S, Uchida K, Okada S, *Copper and iron-induced oxidative damage in non-tumor bearing LEC rats*. Pathology International, 1997. **47**: p. 203-208.
31. Namieno T, T.N., Sasaki M, Dempo K, Mori M, Uchino JI, Kobayashi H, *Clinical and pathological characteristics of LEC rats with spontaneous hepatitis*. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer, ed. Y.M. Mori M, Takeichi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.

Table 1. Cause of Death in the Transplanted LEC Rats and Controls

Group	Cause of death	Number	Age of death (in months)
LEC-HT (n= 20)	Acute hepatitis	1 (F)	4
	Hepatic tumor	1 (F)	17
	Ileus	1 (F)	8
	Trauma	1 (F)	9
	Unknown cause	1 (M)*	16
Control LEC (n= 12)	Acute hepatitis	1(F), 1(M)	3.5
	Hepatic tumor	1(F)	18

* Autopsy showed no hepatic tumors.

Fig. 1. LEC rats developed fewer neoplastic lesions than control LEC rats (5% vs 42%, $p=0.018$). Pre-neoplastic lesions were identified by GST- π immunostaining. Hepatocellular carcinoma (HCC) was characterized by small, well differentiated, multi-focal tumors (< 1 cm).

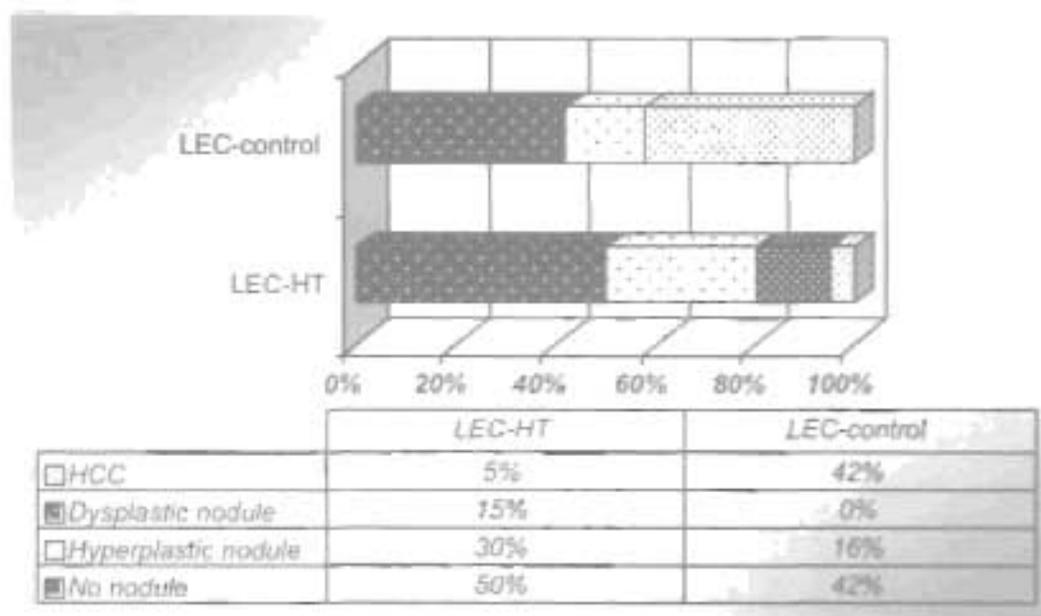


Fig. 2. All LEC-control rats excepted one developed cholangiocellular carcinoma (CCC) whereas 13 out of 20 LEC rats that were transplanted (LEC-HT) developed CCC (92% vs 65%, $p=0.2$). CCC was characterized by small, multiple nodules with severe cholangiolar fibrosis and proliferation.

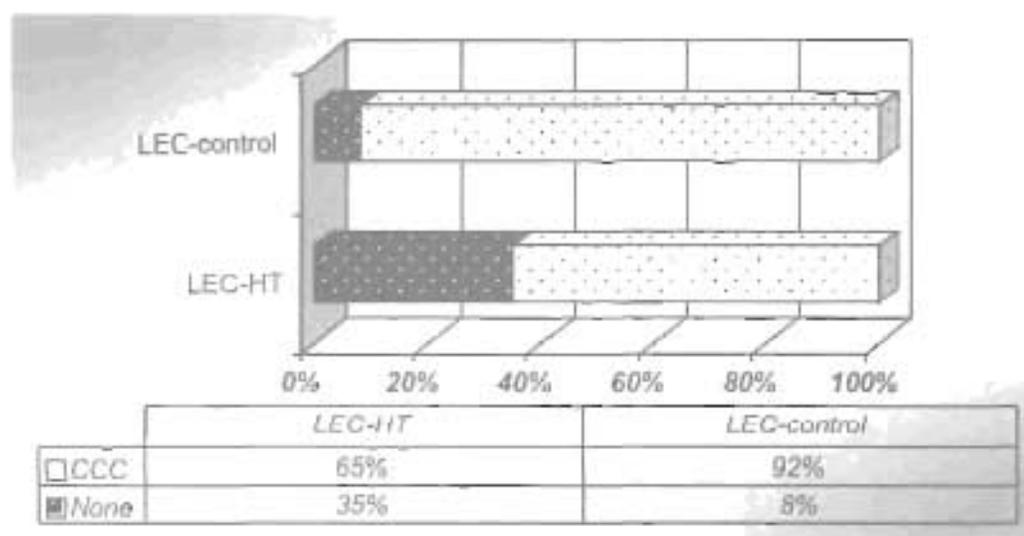


Fig. 3. Non-tumoral tissue was stained with hematoxylin and eosin (H & E) (left) and for GST- π expression (right), a pre-cancerous marker. Hyperplastic nodules, but not normal liver tissue, stained positive and are considered pre-neoplastic lesions.

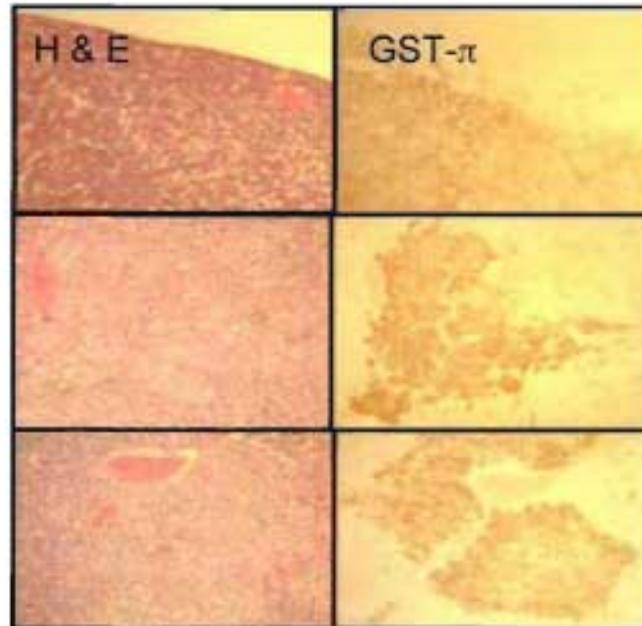


Fig. 4. *Atp7b* mRNA was detected by RT-PCR and expression was detectable in 4/15 LEC rats with hepatocyte transplantation (LEC-HT) rats at 18 months. β -actin is used as an internal control.

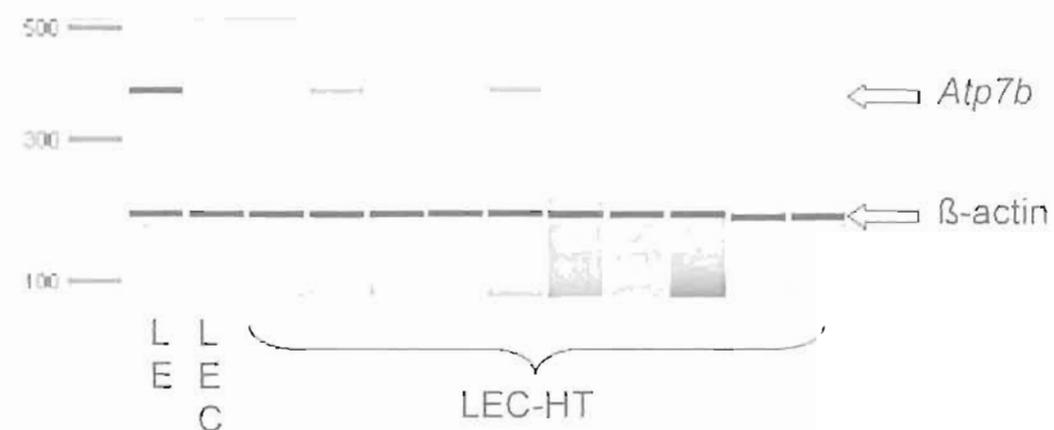


Fig. 5. At 18 months, the presence of transplanted LE cells was demonstrated by immunofluorescence using antibodies to ATP7B. Cells staining for ATP7B can be seen in the livers of control LE rats (A) but not in the livers of LEC rats that were not transplanted (B). The grafted cells in the livers of the LEC rats that were transplanted can be seen in the periportal areas (C, D).

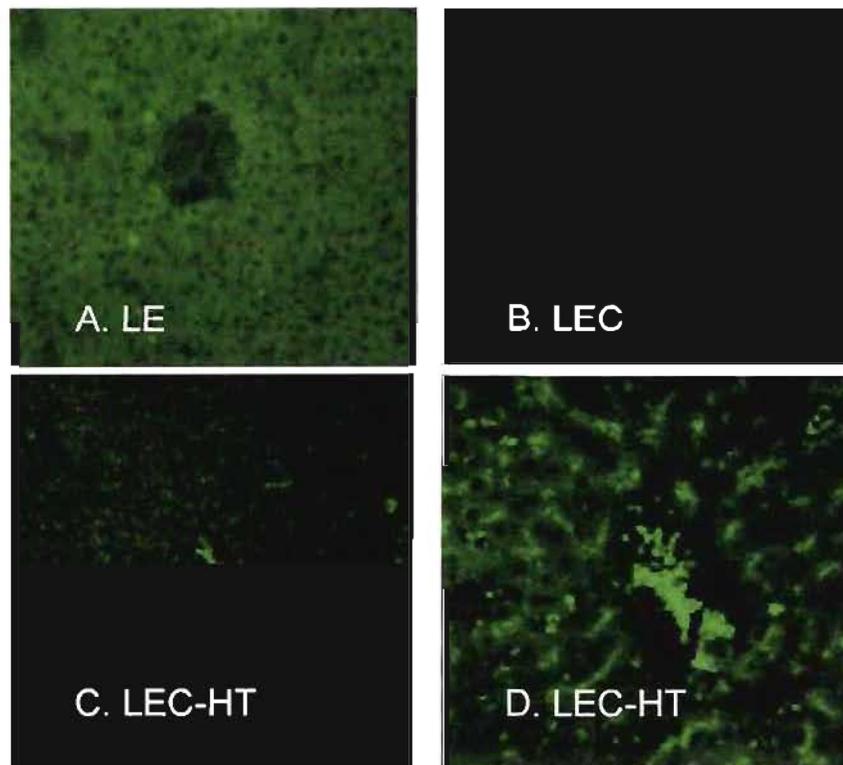
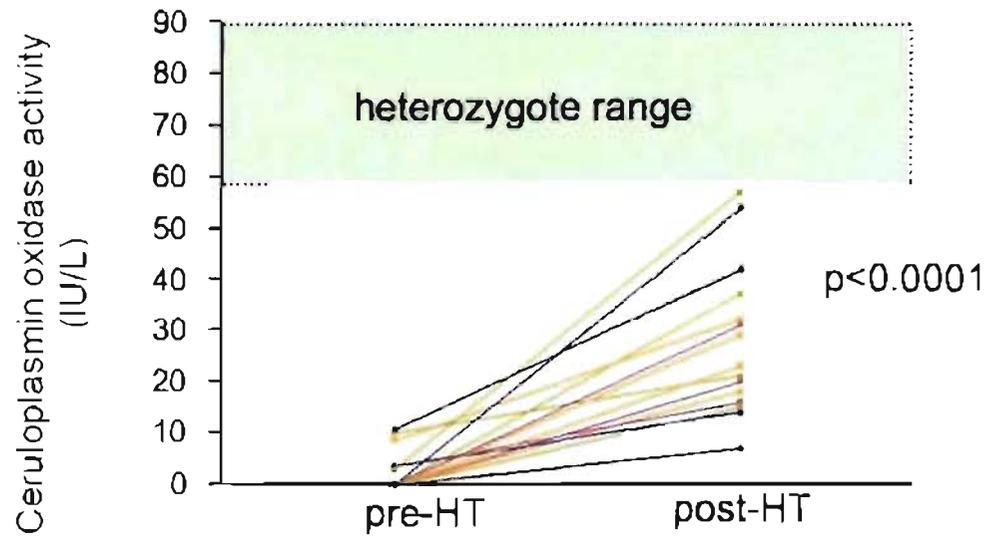


Table 2. Copper and iron contents in the livers and bile of LEC-HT and LEC rat (mean \pm SD)

	Liver*		Bile	
	Cu	Fe	Cu	Fe
	($\mu\text{mol/g}$)	($\mu\text{mol/g}$)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)
LEC-HT (n=15)	11.7 \pm 2.7	20.5 \pm 7.2	7.9 \pm 4.5	19.4 \pm 2.9
LEC (n=9)	11.0 \pm 2.3	19.6 \pm 8.0	6.4 \pm 4.8	7.8 \pm 6.6

* non-tumoral parts only

Fig. 6. Ceruloplasmin oxidase activity measured before and after hepatocyte transplantation (HT) in LEC rats.



DISCUSSION

La transplantation hépatocytaire a déjà été étudiée à maintes reprises dans le contexte des hépatites aiguës. Elle a été démontrée comme prévenant l'hépatite fulminante, réduisant l'inflammation chronique et améliorant la survie à court terme et les fonctions hépatiques chez le rat LEC ainsi qu'avec d'autres modèles animaux comparables[119, 127, 143, 144]. Une étude réalisée par notre groupe de recherche avec la même colonie de rats LEC a été publiée en 2006[145]. Cette étude s'attardait principalement aux effets à court terme de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC. La survie à 6 mois était de 97% chez les rats LEC transplantés (LEC-HT) comparativement à 63% chez les rats LEC-contrôle. À 6 mois, 7 rats sur 12 rats LEC transplantés exprimaient l'ARNm de l'*Atp7b* à la RT-PCR (11.9%±13.6% en pourcentage de rat LE).

La présente étude avait pour but d'observer les effets potentiellement bénéfiques de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC sur le développement de l'hépatite chronique, la cirrhose hépatique et le cancer hépatique (carcinome hépatocellulaire et cholangiocarcinome). Comme il a déjà été démontré dans l'étude de notre première cohorte de rats LEC non-traités, la survie à long terme chez les rats qui survivent à l'hépatite aiguë est directement influencée par les cancers hépatiques. En effet, à l'âge de 12 mois, le taux de carcinomes hépatocellulaires était de 87.9% alors que le taux de cholangiocarcinomes était de 57.6%. La survie à 6 mois était de 63%, la survie à 12 mois de 54% et la survie à

18 mois de 42%. À l'âge de 24 mois, la quasi-totalité des rats LEC non-traités avaient développé un carcinome hépatocellulaire ou un cholangiocarcinome et tous les rats montraient des nodules hyperplasiques et dysplasiques ainsi que de la cholangio-fibrose. Il est donc évident que la mortalité à long terme chez les rats LEC survient des suites de complications reliées aux cancers hépatiques. Les résultats compilés suite à l'étude à long terme de cette cohorte historique sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature[92].

Nous n'avons pas trouvé de différence significative au niveau de la survie à 18 mois entre les rats LEC-HT et les rats LEC-contrôle. En effet, il y a eu très peu de décès avant le moment du sacrifice à 18 mois. Seulement 5 rats du groupe LEC-HT (25%) et 3 rats du groupe LEC-contrôle (25%) sont morts avant le sacrifice. De la même façon, il n'y avait pas de différences significatives quant au poids et aux taux d'AST, d'ALT et de bilirubine totale sérique. Ces résultats pourraient être en partie dus au fait que cette cohorte de rats LEC ne possède pas les mêmes caractéristiques que la cohorte initialement décrite par les Japonais[68, 92] et même décrite par notre groupe en 2001. Toutefois, cette tendance avait déjà été constatée lors de l'étude des effets à court terme de la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC, par notre groupe de recherche[145] ainsi que par d'autres chercheurs[143, 144]. Dans notre étude antérieure, la survie à 6 mois chez les rats mâles LEC-HT était augmentée par rapport à notre cohorte historique alors que la survie était aussi augmentée chez les rats femelles LEC-HT, mais de façon statistiquement non-significative. On retrouve également dans la présente étude un taux de carcinome

hépatocellulaire à 18 moins inférieur à celui observé précédemment. On pourrait donc assister à une forme de sélection ou à l'apparition d'une nouvelle mutation au sein de notre cohorte de rats LEC établie depuis 1996. Par ailleurs, toutes ces études ont été effectuées sur des petits groupes d'animaux et il pourrait donc s'agir d'un échantillonnage inadéquat de la population des rats LEC.

Dans cette étude, nous avons démontré que les taux de carcinomes hépatocellulaires et de cholangiocarcinomes étaient inférieurs dans le groupe des rats LEC-HT comparativement aux rats LEC-contrôle. En effet, seulement 5% des rats LEC-HT ont développé des carcinomes hépatocellulaires, alors que 42% des rats LEC-contrôle étaient atteints ($p=0.018$ avec le test de Fisher). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été notée en comparant l'ensemble des lésions néoplasiques et pré-néoplasiques chez les rats LEC-HT et LEC-contrôle (50% vs 58%, $p=0.647$ avec le test du χ^2). Par ailleurs, tous les rats sauf un du groupe LEC-contrôle ont développé un cholangiocarcinome alors que 13 rats sur 20 du groupe LEC-HT présentaient ces lésions (92% vs 65%, $p=0.2$ avec le test de Fisher). Bien qu'il y ait une tendance claire, le fait que cette différence soit statistiquement non-significative pourrait être du à une puissance trop faible de l'étude ou encore à un impact moins grand de la transplantation hépatocytaire sur la prévention du cholangiocarcinome que du carcinome hépatocellulaire.

Nous avons fait l'utilisation d'un marqueur immuno-histochimique reconnu pour l'identification des lésions pré-néoplasiques, le GST- π [173]. Le GST- π est une glutathione S-transférase et est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires, la plus importante étant son rôle en tant qu'enzyme de phase II qui catalyse la S-conjugaison du glutathion avec des mutagènes, des carcinogènes, des agents anti-cancer et leurs métabolites. Le gène du GST- π est situé sur une petite région du chromosome 11q13 sur lequel sont retrouvés plusieurs gènes associés au cancer ainsi que plusieurs proto-oncogènes (*Bcl-1*, *Prad-1*, *Int-2*, *Hstf-1*, *Sea*)[182].

L'identification de foyers GST- π + a permis de confirmer la présence de lésions pré-néoplasiques dans le foie de tous les rats LEC-HT et LEC-contrôle. À l'histologie, on retrouvait des lésions nodulaires hyperplasiques et dysplasiques qui, tel que discuté précédemment, sont précurseurs de lésions de carcinomes hépatocellulaires[78]. De même, on retrouvait à l'histologie de la cholangiofibrose qui est elle aussi considérée comme un précurseur dans la carcinogenèse hépatique[162]. Par contre, en dépit du fait que des lésions pré-néoplasiques ont également été retrouvées dans les foies des 4 rats LEC-HT qui exprimaient de l'ARNm d'*Atp7b*, aucune lésion de carcinome hépatocellulaire ou de cholangiocarcinome était présente chez ces rats. Cela suggère donc que l'implantation, à de faibles taux, des cellules transplantées chez les rats LEC ne préviendrait pas complètement la carcinogenèse hépatique, mais à tout le moins, la retarderait.

L'hypothèse actuelle voudrait que les hépatocytes transplantés prolifèrent de façon préférentielle par rapport aux hépatocytes-hôtes, dû au stimulus de l'hépatectomie partielle[142] et à celui entraîné par l'accumulation de cuivre au sein des hépatocytes-hôtes[183]. Toutefois, on observe dans cette étude un faible taux d'implantation des cellules transplantées à 18 mois, mesuré par l'immunohistochimie pour l'ATP7B et la RT-PCR pour l'ARNm d'*Atp7b*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce faible taux d'implantation, dont l'utilisation du Tacrolimus seulement pour les 12 premiers mois de l'étude. Cependant, un point en défaveur de cette hypothèse est que la transplantation d'hépatocytes entre rats de souches très apparentées, tels que les rats LE, LEA et LEC, a déjà été démontrée sans l'usage d'immunosuppression[127, 143, 144]. L'observation de plus hauts taux d'implantation à 6 mois dans notre étude antérieure comparé à la littérature actuelle pourrait néanmoins être due à l'utilisation du Tacrolimus[145]. Avec ou sans l'utilisation du Tacrolimus, des mécanismes immunologiques pourraient intervenir chez le rat LEC-HT afin de rejeter les hépatocytes transplantés. Ces mécanismes pourraient être comparés à ceux retrouvés dans le rejet chronique rencontré chez les greffés hépatiques et qui sont liés aux anti-corps ainsi qu'à l'immunité cellulaire.

De plus, les méthodes utilisées pour mesurer le taux d'implantation des cellules transplantées (immuno-histochimie et RT-PCR) pourraient ne pas être représentatives de l'ensemble des spécimens. Malgré le fait que nous utilisons des tranches de section de chaque lobe hépatique, l'implantation cellulaire, tout

comme l'accumulation intra-hépatique de cuivre[45], pourrait être distribuée de façon non-uniforme à l'intérieur d'un même lobe. Un argument soutenant cette hypothèse est que l'activité de la céruloplasmine oxidase a augmenté chez tous les rats LEC-HT et non pas seulement chez les 4 rats LEC-HT qui exprimaient l'ARNm d'*Atp7b*.

Finalement, la présence de lésions de carcinomes hépatocellulaires et de cholangiocarcinomes pourrait nuire à la prolifération des cellules transplantées. Il est difficile de supporter cette hypothèse par la littérature actuelle puisqu'aucune autre étude ne s'est intéressée aux effets à long terme de la transplantation hépatocytaire.

De façon surprenante, le niveau de cuivre dans le foie des rats LEC-HT était plus élevé que dans le foie des rats LEC-contrôle à 18 mois. Par ailleurs, après une sous-analyse des portions tumorales et non-tumorales, nous avons constaté que le niveau de cuivre était plus élevé dans les portions non-tumorales du foie des rats LEC-HT et LEC-contrôle. Une explication possible pourrait être que les tissus néoplasiques et pré-néoplasiques n'accumulent pas le cuivre de la même façon que le tissu hépatique sain. En effet, comme les rats LEC-contrôle avaient une plus grande proportion de carcinomes hépatocellulaires et de cholangiocarcinomes, les niveaux plus faibles de cuivre intra-hépatique pourraient être attribués à cette raison. Cependant, notre étude antérieure avait permis de démontrer qu'à 6 mois, les niveaux de cuivre intra-hépatique chez les rats LEC-HT exprimant l'ARNm

d'*Atp7b* étaient plus faibles que chez les rats LEC-HT n'exprimant pas l'ARNm d'*Atp7b*[145]. Cette observation n'a pas été faite dans la présente étude, peut-être dû au très faible taux de rats LEC-HT exprimant l'ARNm d'*Atp7b* à 18 mois. Cette affirmation serait toutefois contradictoire à l'affirmation que le cuivre intra-hépatique serait plus faible dans les lésions pré-néoplasiques et néoplasiques puisque les rats LEC-HT exprimant l'ARNm d'*Atp7b* devraient présenter moins de lésions néoplasiques. Ces phénomènes demandent plus d'études pour en élucider les mécanismes.

L'accumulation intra-hépatique du cuivre chez les rats LEC joue un grand rôle dans la carcinogenèse hépatique via les dommages à l'ADN, dont la mutation du gène p53[90, 109]. Renforçant cette même idée, il a été démontré que l'utilisation de chélateurs du cuivre visant à réduire l'accumulation de cuivre dans les hépatocytes prévenait le développement de cancers hépatiques chez les rats LEC[73, 74].

Parallèlement à ces trouvailles, des études ont démontré que chez le rat LEC, durant les phases d'hépatite fulminante et de carcinogenèse hépatique, les niveaux d'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (mesurés par immuno-histochimie et ARNm) augmentaient de façon substantielle[184]. Si on pose l'hypothèse fort plausible que ces deux phases sont dues à l'accumulation hépatique de cuivre, il devient donc évident qu'il y aurait un lien entre cette accumulation et la production d'HGF. Le

rôle de cette production accrue d'HGF serait de promouvoir la régénéscence des cellules hépatique, en ces périodes de destruction massive.

Deux mécanismes ont été proposés pour la régénéscence des cellules hépatiques via l'HGF suite à une agression[185]. Le premier fonctionne de façon paracrine et est retrouvé dans le contexte de l'hépatite et le deuxième fonctionne de façon endocrine et est retrouvé dans le contexte de l'hépatectomie partielle. Ces deux mécanismes résulteraient de l'activation de différents inducteurs de l'HGF. Il s'agirait d'une explication plausible pour la plus forte implantation de cellules transplantées observée à 6 mois[145] alors que ces deux mécanismes se surimposent, tandis qu'à 18 mois, la production d'HGF pourrait alors favoriser les cellules néoplasiques plutôt que les cellules transplantées. En effet, il a été postulé que des cellules hépatiques néoplasiques exhibaient une production d'HGF[184]. Supportant cette évidence, il a déjà été prouvé que des cellules humaines de carcinome pulmonaire[186] et de glioblastome[187] produisaient de l'HGF.

De plus, les mutations créées sur le gène p53 par l'accumulation intra-hépatocytaire de cuivre empêchent ce dernier de jouer son rôle de gardien du génome et d'arrêter les cycles cellulaires et d'entraîner l'apoptose[104, 109]. Les cellules pré-néoplasiques et néoplasiques pourraient ainsi proliférer de façon anarchique et créer des lésions cancéreuses au sein du foie malade. Il serait fort intéressant d'étudier les liens pouvant exister entre les facteurs de croissance tels

que l'HGF, les dommages à l'ADN créés par l'accumulation de cuivre et le rôle du gène p53 et autres gènes potentiellement responsables des mécanismes d'apoptose.

En addition au phénomène d'accumulation du cuivre au niveau du foie, l'accumulation du fer pourrait aussi être responsable de la carcinogénèse hépatique dans la maladie de Wilson[179]. Les rats LEC, tout comme les humains atteints de la maladie de Wilson, possèdent une activité déficiente de la céruloplasmine oxidase[4, 68]. La céruloplasmine joue un rôle important dans le métabolisme du fer[30, 31]. Elle possède une forte activité ferroxidase qui catalyse la réaction de conversion du fer sous sa forme Fe^{2+} vers sa forme Fe^{3+} . Cette réaction est essentielle pour le transport du fer à travers la membrane cellulaire. Elle permet au fer de se retrouver sous sa forme circulante, la transferrine. Étant donné la très faible efficacité de la céruloplasmine dans la maladie de Wilson et chez les rats LEC, on retrouve une importante accumulation de fer en intra-hépatique[115, 178]. Nos résultats montrent des niveaux similaires de fer dans les foies des rats LEC-HT et LEC-contrôle. Même en procédant à la sous-analyse des tranches de section tumorales et non-tumorales, on retrouvent des niveaux de fer similaires. Par contre, bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs, on observe tout de même une tendance vers un niveau plus élevé de fer dans la bile des rats LEC-HT. Ceci pourrait signifier une meilleure excrétion de fer dans la bile des rats transplantés, impliquant donc une meilleure activité céruloplasmine oxidase tel que démontré.

Toutefois, on ne retrouve pas, chez les rats LEC et les patients atteints de la maladie de Wilson, la même accumulation de fer responsable de cancers hépatiques que chez les patients atteints de l'hémochromatose. Le mécanisme de carcinogenèse hépatique est, à notre avis, différent dans la maladie de Wilson. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette carcinogenèse, tel que l'aspect génétique, l'accumulation intra-hépatique de cuivre et de fer, la mutation de gènes suppresseur tumoraux et l'activation de proto-oncogènes. Il est donc difficile d'imputer la susceptibilité accrue aux cancers hépatiques seulement à l'accumulation de cuivre ou de fer.

CONCLUSION

Finalement, nous pouvons conclure que la transplantation hépatocytaire chez le rat LEC, même à de faibles taux de repopulation, a réussi à retarder le développement de cancers hépatiques. Par contre, la présence de lésions pré-néoplasiques chez tous les rats transplantés confirme le fait que dans notre étude, la transplantation d'hépatocytes n'a pu prévenir complètement la carcinogenèse hépatique associée à l'accumulation de fer et de cuivre, mais n'a fait que la retarder.

Tel que discuté précédemment, nous croyons que ceci pourrait être en partie dû au faible taux d'implantation des hépatocytes transplantés à 18 mois. Des stratégies pour augmenter le taux d'implantation à long terme des hépatocytes sont nécessaires pour mesurer l'impact véritable de la transplantation hépatocytaire sur la carcinogenèse hépatique. Plusieurs avenues d'exploration sont possibles: amélioration du stimulus induisant la prolifération cellulaire, agents immunosuppresseurs, transplantation autologue avec thérapie génique et transplantations cellulaires répétées.

Ces résultats sont d'autant plus encourageants car la transplantation hépatocytaire dans le contexte de prévention de la carcinogenèse hépatique pourrait être utilisée pour le traitement de plusieurs autres maladies hépatiques métaboliques. En effet, il existe plusieurs autres maladies qui, à l'instar de la maladie de Wilson,

présentent un taux accru de cancers hépatiques: l'hémochromatose, la déficience en α -1 anti-trypsine, la tyrosinémie de type A, etc.

Avec les développements récents en génétique, la thérapie génique devient une thérapie de plus en plus intéressante. La transplantation autologue d'hépatocytes ayant subi une thérapie génique pour remplacer le gène *ATP7B* mutant pourrait s'avérer curative autant pour les complications à court terme qu'à long terme engendrées par la maladie de Wilson. De la même façon, ceci peut être extrapolé à toutes maladies hépatiques dont la pathogénèse en est un gène mutant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wilson SAK, *Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*. Lancet, 1912. 1: p. 1115-1119.
2. Wilson SAK, *Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*. Brain, 1912. 34: p. 295-507.
3. Cummings JN, *The copper and iron content of the liver and brain in the normal and hepatolenticular degeneration*. Brain, 1948. 71: p. 410-417.
4. Scheinberg IH, G.D., *Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration*. Science, 1952. 116: p. 484-485.
5. Walshe JM, *Penicillamine: a new oral therapy for Wilson's disease*. American Journal of Medicine, 1956. 21: p. 487-492.
6. Cox DW, R.E., *Wilson disease*. 7th ed. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, ed. Feldman. 2002: Saunders-Elsevier. 3252-3267.
7. Gollan JL, G.T., *Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects*. Journal of Hepatology, 1998. 28(Suppl 1): p. 28-36.
8. Schilsky ML, *Wilson disease: genetic basis of copper toxicity and natural history*. Seminars in Liver Disease, 1996. 16: p. 83-95.
9. Bearn AG, *A genetical analysis of 30 families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration)*. Annals of Human Genetics, 1960. 24: p. 33-43.
10. Frydman M, B.-T.B., Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, Goldwitch Z, *Assignment of the gene of Wilson's disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1985. 82: p. 1819-1821.
11. Bull PC, T.G., Rommens JM, Forbes JR, Cox DW, *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nature Genetics, 1993. 5: p. 327-337.
12. Bull PC, C.D., *Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport*. Trends in Genetics, 1994. 10: p. 246-252.
13. Gitlin JD, *Wilson disease*. Gastroenterology, 2003. 125: p. 1868-1877.
14. Riordan SM, W.R., *The Wilson's disease gene and phenotypic diversity*. Journal of Hepatology, 2001. 34: p. 165-171.
15. Culotta VC, G.J., *Disorders of copper transport*. The molecular and metabolic basis of inherited disease, ed. B.A. Scriver CR, Sly WS, Valle D. Vol. 3. 2001, New York: McGraw-Hill. 3105-3136.
16. Brewer GJ, Y.-G.V., *Wilson disease*. Medicine, 1992. 71: p. 139-164.
17. Tao TY, G.J., *Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease*. Hepatology, 2003. 37: p. 1241-1247.
18. Lee J, P.J., Thiele DJ, *Essential role for mammalian copper transporter *Ctrl* in copper homeostasis and embryonic development*. Proceedings of

- the National Academy of Science of the United States of America, 2001. **98**: p. 6842-6847.
19. Kuo YM, Z.B., Cosco D, Gitshier J, *The copper transporter Ctr1 provides an essential function in mammalian embryonic development*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2001. **98**: p. 6836-6841.
 20. O'Halloran TV, C.V., *Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**: p. 25057-25060.
 21. Huffman DL, O.H.T., *Function, structure and mechanism of intracellular copper trafficking proteins*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**: p. 677-701.
 22. Wernimont AK, H.D., Lamb AL, O'Halloran TV, Rosenzweig AC, *Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins*. Nature Structural and Molecular Biology, 2000. **7**: p. 766-771.
 23. Larin D, M.C., Das K, Ross B, Yang AS, Gilliam TC, *Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 28497-28504.
 24. Hamza I, S.M., Klomp LW, Gitlin JD, *Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1999. **96**: p. 13363-13368.
 25. Cobine PA, P.F., Winge DR, *Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes*. Biochimica and Biophysica Acta, 2006. **1763**: p. 759-772.
 26. Palmiter RD, *The elusive function of metallothioneins*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1998. **95**: p. 8428-8430.
 27. Kelly EJ, P.R., *A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothioneins*. Nature Genetics, 1996. **13**: p. 219-222.
 28. Hung IH, S.M., Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD, *Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast saccharomyces cerevesiae*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 21461-21466.
 29. Schaefer M, H.R., Failla ML, Gitlin JD, *Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver*. American Journal of Physiology, 1999. **276**: p. G639-G646.
 30. Siah CW, T.D., Olynyk JK, *Iron overload*. Clinica Chimica Acta, 2005. **358**: p. 24-36.
 31. Hellman NE, G.J., *Ceruloplasmin metabolism and function*. Annual Review in Nutrition, 2002. **22**: p. 439-458.
 32. Cox DW, R.E., *Genes of the copper pathway*. American Journal of Human Genetics, 1995. **56**: p. 828-834.

33. Mercer JF, B.N., Stevenson J, Strausak D, Llanos RM, *Copper-induces trafficking of the Cu-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis*. *Biometals*, 2003. **16**: p. 175-184.
34. Walshe JM, *Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients*. *Quarterly Journal of Medicine*, 1989. **70**: p. 253-263.
35. Schilsky ML, S.I., Sternlieb I, *Prognosis of Wilsonian chronic active hepatitis*. *Gastroenterology*, 1991. **100**: p. 762-767.
36. Emre S, A.E., Ozdemir S, Schilsky M, Rathna Varma CV, Thung SN, Sternlieb I, Guy SR, Sheiner PA, Schwartz ME, Miller CM, *Orthotopic liver transplantation for Wilson's disease: a single-center experience*. *Transplantation*, 2001. **72**: p. 1232-1236.
37. McCullough AJ, F.C., Thistle CL, Baldus WP, Ludwig J, McCall JT, Dickson ER, *Diagnosis of Wilson's disease presenting as fulminant hepatic failure*. *Gastroenterology*, 1983. **84**: p. 161-167.
38. Polio J, E.R., Chow A, Wood WM, Atterbury CE, *Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 1989. **11**: p. 220-224.
39. Oder W, P.L., Grimm G, *Wilson's disease: evidence of subgroups derived from clinical findings and brain lesions*. *Neurology*, 1993. **43**: p. 120-124.
40. Oder W, G.G., Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deecke L, *Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases*. *Journal of Neurology*, 1991. **238**: p. 281-287.
41. Cartwright GE, *Diagnosis of treatable Wilson's disease*. *New England Journal of Medicine*, 1978. **298**: p. 1347-1350.
42. Brewer GJ, A.F., *Wilson's disease: clinical management and therapy*. *Journal of Hepatology*, 2005. **42**: p. S13-S21.
43. Deguti MM, T.U., Barbosa ER, Cancado EL, *The eye in Wilson's disease: sunflower cataract associated with Kayser-Fleisher ring*. *Journal of Hepatology*, 2002. **37**: p. 700.
44. Martins da Costa C, B.D., Portmann B, *Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease*. *Hepatology*, 1992. **15**: p. 609-615.
45. Faa G, N.V., Demelia L, *Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease*. *Journal of Hepatology*, 1995. **22**: p. 303-308.
46. Tanzi RE, P.K., Chernov I, *The Wilson disease gene is a copper-transporting ATPase with homology to the Menkes gene*. *Nature Genetics*, 1993. **5**: p. 344-350.
47. Thomas GR, F.J., Roberts EA, *The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences*. *Nature Genetics*, 1995. **9**: p. 210-217.
48. Loudianos G, D.V., Lovicu M, *Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations*. *Journal of Medical Genetics*, 1999. **36**: p. 833-836.

49. Brewer GJ, T.C., Aisen AM, Hill GM, *Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy.* Archives of Neurology, 1987. **44**: p. 490-493.
50. Brewer GJ, F.J., Hereda P, *Diagnosis and treatment of Wilson's disease.* Seminars in Neurology, 1999. **19**: p. 261-270.
51. Walshe JM, *Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride.* Lancet, 1982. **1**: p. 643-647.
52. Brewer GJ, H.P., Kluin KJ, Carlson M, Askari F, Dick RB, , *Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: initial therapy in a total of 55 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy.* Archives of Neurology, 2003. **60**: p. 379-385.
53. Brewer GJ, D.R., Johnson VD, Brunberg JA, Kluin KJ, Fink JK, *Treatment of Wilson's disease with zinc: long-term follow-up studies.* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1998. **132**: p. 264-278.
54. Hall AC, Y.B., Bremner I, *Intestinal metallothioneins and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat.* Journal of Inorganic Biochemistry, 1979. **11**: p. 57-66.
55. Menard MP, M.C., Cousins RJ, *Regulation of intestinal metallothioneins biosynthesis in rats by dietary zinc.* Journal of Nutrition, 1981. **111**: p. 1353-1361.
56. Yuzbasiyan-Gurkan V, G.A., Nostrant T, Cousins RJ, Brewer GJ, *Treatment of Wilson's disease with zinc: intestinal metallothioneins induction.* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1992. **120**: p. 380-386.
57. Mills CF, E.-G.T., Bremner I, *Effects of molybdate, sulfide and tetrathiomolybdate on copper metabolism in rats.* Journal of Inorganic Biochemistry, 1981. **14**: p. 189-207.
58. Brewer GJ, D.R., Yuzbasiyan-Gurkan V, Tankanow R, Young AB, Kluin KJ, *Initial therapy of patients with Wilson's disease with tetrathiomolybdate.* Archives of Neurology, 1991. **48**: p. 42-47.
59. Brewer GJ, D.R., Johnson V, Wang Y, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kluin KJ, *Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: initial therapy in 17 neurologically affected patients.* Archives of Neurology, 1994. **51**: p. 545-554.
60. Brewer GJ, J.V., Dick RD, Kluin KJ, Fink JK, Brunberg JA, *Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: initial therapy in 33 neurologically affected patients and follow-up with zinc therapy.* Archives of Neurology, 1996. **53**: p. 1017-1025.
61. Brewer GJ, S.M., Hederda P, Carlson MD, Fink JK, Askari FK, *Double-blind study of initial therapy of neurological Wilson's disease.* Journal of Investigative Medicine, 2003. **51**: p. 51.
62. Askari FK, G.J., Dick RD, Johnson VD, Brewer GJ, *Treatment of Wilson's disease with zinc: initial treatment of the hepatic decompensation presentation with trientine and zinc.* Archives of Neurology, 2003. **142**: p. 385-390.

63. Nazer H, E.R., Mowat ARW, *Wilson's disease: clinical presentation and use of prognostic index*. Gut, 1986. **27**: p. 1377-1381.
64. Theophilos MB, C.D., Mercer JF, *The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease*. Human Molecular Genetics, 1996. **5**: p. 1619-1624.
65. Buiakova OI, X.J., Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, Mekios C, Scheinberg IH, Gilliam TC, *Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation*. Human Molecular Genetics, 1999. **8**: p. 1665-1671.
66. Li Y, T.Y., Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J, *Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis: a model of Wilson's disease*. Journal of Clinical Investigation, 1991. **87**: p. 1858-1861.
67. Yoshida MC, S.M., Masuda R, *Origin of the LEC strain with a new mutation causing hereditary hepatitis*. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer, ed. Y.M. Mori M, Takeishi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.
68. Namieno T, T.N., Sasaki M, Dempo K, Mori M, Uchino J, Kobayashi H, *Clinical and pathological characteristics of LEC rats with spontaneous hepatitis*. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer, ed. Y.M. Mori M, Takeishi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.
69. Yoshida MC, M.R., Sasaki M, Takeichi N, Kobayashi H, Dempo K, Mori M, *New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat*. Journal of Heredity, 1987. **78**: p. 361-365.
70. Cuthbert J, *Wilson's disease: a new gene and an animal model for an old disease*. Journal of Investigative Medicine, 1995. **43**: p. 323-336.
71. Masuda R, Y.M., Sasaki M, Dempo K, Mori M, *Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene*. Laboratory Animals, 1988. **22**: p. 166-169.
72. Togashi Y, L.Y., Kang JH, Takeichi N, Fujioka Y, Nagashima K, Kobayashi H, *D-penicillamine prevents the development of hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats with abnormal copper metabolism*. Hepatology, 1992. **15**: p. 82-87.
73. Jong-Hon K, T.Y., Kasai H, Hosokawa M, Takeichi N, *Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine*. Hepatology, 1993. **18**: p. 614-620.
74. Sone K, M.M., Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, Sugimura T, Nagao M, *Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride*. Hepatology, 1996. **23**: p. 764-770.
75. American Cancer Society, *Cancer fact and FIGS 2005*. 2005.
76. Wang XW, H.S., Huo T, Wu C, Forgues M, Hfseth L.J, Brechot C, Harris CC, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 43-47.

77. Hertl M, C.A., *Liver transplantation for malignancy*. *Oncologist*, 2005. **10**: p. 269-281.
78. Farazi PA, D.A., *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. *Nature Cancer Reviews*, 2006. **6**: p. 674-687.
79. Anthony P, *Pathology of the liver*, ed. B.A. MacSween R, Portmann B, Ishak K, Scheuer P, Anthony P. 2002, London, New York, Sydney, Toronto: Churchill-Livingstone.
80. Christen S, H.T., Shigenaga MK, Ames BN, *Chronic inflammation, mutation and cancer*. *Microbes and malignancy: infection as a cause of cancer*, ed. H.S. Parsonnet J. 1999, New York: Oxford University Press.
81. Bartsch H, N.J., *Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis*. *Cancer Detection and Prevention*, 2004. **28**: p. 385-391.
82. Oshima H, B.H., *Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis*. *Mutation Research*, 1994. **305**: p. 253-264.
83. Hussain SP, H.L., Harris CC, *Radical causes of cancer*. *Nature Reviews in Cancer*, 2003. **3**: p. 276-285.
84. Oshima H, T.M., Sawa T, *Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis*. *Archives of Biochemical Biophysics*, 2003. **417**: p. 3-11.
85. Britton RS, *Metal-induced hepatotoxicity*. *Seminars in Liver Disease*, 1996. **16**: p. 3-12.
86. Gottlieb TM, O.M., *p53 in growth control and neoplasia*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1996. **1287**: p. 77-102.
87. Schwartz D, R.V., *p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress*. *Seminars in Cancer Biology*, 1988. **8**: p. 325-336.
88. Greenblatt MS, B.W., Hollstein M, Harris CC, *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. *Cancer Research*, 1994. **54**: p. 855-878.
89. Nigro JM, B.S., Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B, *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types*. *Nature* 1989. **342**: p. 705-708.
90. Narayanan VS, F.C., Levenson CW, *Tumor suppressor protein p53 mRNA and sub-cellular localization are altered by changes in cellular copper in human HepG2 cells*. *Journal of Nutrition*, 2001. **131**: p. 1427-1432.
91. Strand S, H.W., Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani S, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PH, *Hepatic failure and liver damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis*. *Nature Medicine*, 1998. **4**: p. 588-593.
92. Masuda R, Y.M., Sasaki M, Dempo K, Mori M, *High susceptibility to spontaneous development of hepatocellular carcinoma in LEC rats. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer*, ed. Y.M. Mori M, Takeishi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.

93. Chowdhury JR, G.M., Gupta S, *Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits.* Science, 1991. **254**: p. 1802-1805.
94. Choudhury S, Z.R., Frenkel K, Kawamori T, Chung FL, Roy R, *Evidence of alterations in base excision repair of oxidative DNA damage during spontaneous hepatocarcinogenesis in Long-Evans Cinnamon rats.* Cancer Research, 2003. **63**: p. 7704-7707.
95. Walshe JM, W.E., Sams V, Nordlinger H, *Abdominal malignancies in patients with Wilson's disease.* Quarterly Journal of Medicine, 2003. **96**: p. 657-662.
96. Rosen N, B.I., Schwartz AM, Cohen P, Desean V, Israel MA, *Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues.* Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**: p. 13754-13759.
97. Masaki T, O.M., Shiratori Y, Rengifo W, Matsumoto K, Maeda S, Kato N, Kanai F, Komatsu Y, Nishioka M, Omata M, *pp60c-src activation in hepatocellular carcinoma of humans and LEC rats.* Hepatology, 1998. **27**: p. 1257-1264.
98. Urabe Y, N.K., Higashi T, Nakatsukasa H, Hino N, Ashida K, Kinugasa N, Yoshida K, Uematsu S, Tsuji T, *Telomere length in human liver diseases.* Liver, 1996. **16**: p. 293-297.
99. Artandi SE, *Telomeres, telomerase and human disease.* New England Journal of Medicine, 2006. **355**: p. 1195-1197.
100. Plentz RR, C.M., Bleck JS, Flemming P, Kubicka S, Manns MP, Rudolph KL, *Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma.* Hepatology, 2004. **40**: p. 80-86.
101. Plentz RR, S.B., Flemming P, Gebel M, Kreipe H, Manns MP, Rudolph KL, Wilkens L, *Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma.* Hepatology, 2005. **42**: p. 522-526.
102. Nagao K, T.M., Endo H, Hisatomi H, Hijiki K, *Telomerase reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma.* Journal of Gastroenterology, 1999. **34**: p. 83-87.
103. Hainaut P, R.N., Davies M, Milner J, *Modulations of copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role of Cu(II)/Cu(I) redox mechanisms.* Oncogene, 1995. **10**: p. 27-32.
104. Verhagh GW, R.M., Hainaut P, *Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intra-cellular level of copper.* Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**: p. 5699-5706.
105. Becker TW, K.G., Witte L, *DNA single and double strand breaks induced by aliphatic and aromatic aldehydes in combination with copper(II).* Free Radical Research, 1996. **24**: p. 325-332.
106. Bhunya SP, J.G., *Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo system.* Mutation Research, 1996. **367**: p. 57-63.

107. Yamamoto K, K.S., *Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions: the role of hydroxyl radical and hydrogen atom*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**: p. 1509-1515.
108. Hussain SP, A.P., Raja K, *Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload disease*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2000. **97**: p. 12770-12775.
109. Tassabehji NM, V.J., Levenson CW, *Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human HepG2 cells*. Experimental Biology and Medicine, 2005. **230**: p. 699-708.
110. Hu W, F.Z., Eveleigh J, *The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma*. Carcinogenesis, 2002. **23**: p. 1781-1789.
111. Favier A, *Le stress oxydant*. L'Actualité Biochimique, 2003. **novembre-décembre**: p. 108-115.
112. Cheng WS, G.S., Redeker AG, *Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease*. Liver, 1992. **12**: p. 42-45.
113. Kosminkova EN, G.S., Ponomarev AB, *The development of diffuse cholangiocarcinoma in a female patient with long-term undiagnosed Wilson's disease*. Ter Arkh, 1995. **67**: p. 85-87.
114. Wilkinson ML, P.B., Williams R, *Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper*. Gut, 1983. **24**: p. 767-771.
115. Kato J, K.Y., Sugarawa N, Katsuki S, Shintani N, Fujikawa K, Miyazaki E, Kobune M, Takeichi N, Miitsu Y, *Abnormal hepatic iron accumulation in LEC rats*. Japanese Journal of Cancer Research, 1993. **84**: p. 219-222.
116. Hattori A, S.M., Enomoto K, Tsuzuki N, Isomura H, Kojima T, Kamibayashi Y, Sugawara N, Sugiyama T, Mori M, *The high hepatocarcinogen susceptibility of LEC rats is genetically independent of abnormal copper accumulation in the liver*. Carcinogenesis, 1995. **16**: p. 491-494.
117. Huster D, F.M., Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT, Lutsenko S, *Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b-/- (Wilson disease gene) knockout mice*. American Journal of Pathology, 2006. **168**: p. 423-434.
118. Bumgardner GL, F.C., Sutherland DE, *Prospects for hepatocyte transplantation*. Hepatology, 1988. **8**: p. 1158-1161.
119. Horslen SP, F.I., *Hepatocyte transplantation*. Transplantation, 2004. **77**: p. 1481-1486.
120. United Network for Organ Sharing. 2005.
121. Mity RR, H.R., Dhawan A, *Progress in human hepatocytes: isolation, culture and cryopreservation*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2002. **13**: p. 463-467.
122. Mity RR, H.R., Aw MM, *Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function*. Cell Transplantation, 2003. **12**: p. 69-74.

123. Matas AJ, S.D., Steffes MW, *Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats*. *Science*, 1976. **192**: p. 892-894.
124. Makowka L, R.L., Falk RE, *Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngenic, allogenic and xenogenic hepatocyte transplantation*. *Surgery*, 1980. **88**: p. 244-253.
125. Nagata H, I.M., Cai J, *Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation*. *Gastroenterology*, 2003. **124**: p. 422-431.
126. Habibullah CM, S.I., Qamar A, *Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure*. *Transplantation*, 1994. **58**: p. 951-952.
127. Yoshida Y, T.Y., Lee GH, *Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans Cinnamon rats*. *Gastroenterology*, 1996. **111**: p. 1654-1660.
128. Ponder KP, G.S., Leland F, *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1991. **88**: p. 1217-1221.
129. Rozga J, H.M., Moscioni AD, *Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats*. *Cell Transplantation*, 1995. **4**: p. 237-243.
130. Overturf K, A.-D.M., Tanguay R, *Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinemia type 1*. *Nature Genetics*, 1996. **12**: p. 266-273.
131. De Vree JM, O.R., Bosma PJ, *Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Gastroenterology*, 2000. **119**: p. 1720-1730.
132. Michel JL, R.D., Rambaud C, *Intrasplenic transplantation of hepatocytes in spf-ash mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency*. *Chirurgie*, 1993. **119**: p. 666-671.
133. Wiederkehr JC, P.R., *Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state: a study in the Watanabe rabbit*. *Transplantation*, 1990. **50**: p. 466-471.
134. Kocken JM, B.R.I., Bijma AM, *Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model*. *Transplantation*, 1996. **62**: p. 358-364.
135. Gagandeep S, S.R., Slehria S, *Hepatocyte transplantation improves survival in mice with liver toxicity induced by hepatic overexpression of Mad1 transcription factor*. *Molecular Therapy*, 2000. **1**: p. 358-365.
136. Kobayashi N, I.M., Nakamura J, *Treatment of carbon tetrachloride and phenobarbital-induced chronic liver failure with intrasplenic hepatocyte transplantation*. *Cell Transplantation*, 2000. **9**: p. 671-673.
137. Gupta S, R.P., Sokhi R, *Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat livers plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium*. *Hepatology*, 1999. **29**: p. 509-519.

138. Gupta S, C.N., Jagtiani R, *A novel system for transplantation of isolated hepatocytes utilizing HBsAg-producing transgenic donor cells.* Transplantation, 1990. **50**: p. 472-475.
139. Rajvanshi P, K.A., Bhargava KK, *Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule.* Hepatology, 1996. **23**: p. 482-496.
140. Laconi S, P.S., Porcu PP, *Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine.* American Journal of Pathology, 2001. **158**: p. 771-777.
141. Gupta S, R.P., Aragona E, Yerneni PR, Lee CD, Burk RD, *Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl₄ treatment and hepatocyte growth factor infusion.* American Journal of Physiology, 1999. **276**: p. G629-G638.
142. Guha C, S.A., Gupta S, Alfieri A, Gorla GR, Gagandeep S, Sokhi R, Chowdhury NR, Tanaka KE, *Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation.* Cancer Research, 1999. **59**: p. 5871-5874.
143. Malhi H, I.A., Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S, *Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease.* Gastroenterology, 2002. **122**: p. 438-447.
144. Irani AN, M.H., Slehria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S, *Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease.* Molecular Therapy, 2001. **3**: p. 329-334.
145. Park SM, V.K., Lallier M, Cloutier AS, Brochu P, Alvarez F, Martin SR, *Hepatocyte transplantation in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease.* Cell Transplantation, 2006. **15**: p. 13-22.
146. Mito M, K.M., Kawaura Y, *Hepatocyte transplantation in man.* Transplantation Proceedings, 1992. **24**: p. 3052-3053.
147. Strom SC, C.J., Fox IJ, *Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease.* Seminars in Liver Disease, 1999. **19**: p. 39-48.
148. Grossman M, R.D., Muller DW, *A piloy study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia.* Nature Medicine, 1995. **1**: p. 1148-1154.
149. Fox IJ, C.J., Kaufmann SS, *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation.* New England Journal of Medicine, 1998. **338**: p. 1422-1426.
150. Strom SC, F.R., Rubinstein WS, *Transplantation of human hepatocytes.* Transplantation Proceedings, 1997. **29**: p. 2103-2106.
151. Horslen SP, M.T., Goertzen TC, *Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder.* Pediatrics, 2003. **111**: p. 1262-1267.

152. Muraca M, N.D., Parenti A, *Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study*. Transplantation, 2002. **73**: p. 890-896.
153. Sokal EM, S.F., Bourgeois A, *Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety and metabolic follow-up*. Transplantation, 2003. **76**: p. 735-738.
154. Rhim JA, S.E., Degen JL, *Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation*. Science, 1994. **263**: p. 1149-1152.
155. Overturf K, A.-D.M., Finegold M, *The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion*. American Journal of Pathology, 1999. **155**: p. 2135-2143.
156. Cubero FJ, M.P., Mula N, Ortiz A, Barrutia MG, Codesal FJ, Arahuetes RM, *Hepatic proliferation in Gunn rats transplanted with hepatocytes: effects of retrorsine and tri-iodothyronine*. Cell Proliferation, 2005. **38**: p. 137-146.
157. Powell LW, B.M., Halliday JW, Jazwinska EC, *Hemochromatosis: genetics and pathogenesis*. Seminars in Liver Disease, 1996. **16**: p. 55-63.
158. Elzouki AN, E.S., *Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. European Journal of Gastroenterology, 1996. **8**: p. 989-994.
159. Wu J, F.J., Chen HS, Cox DW, *The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene*. Nature Genetics, 1994. **7**: p. 541-545.
160. Mori M, H.A., Sawaki M, Tsuzuki N, Sawada N, Oyamada M, Sugawara N, Enomoto K, *The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer and much more*. American Journal of Pathology, 1994. **144**: p. 200-204.
161. Miyoshi E, F.J., Hayashi N, Taniguchi N, *LEC rats: an overview of the recent findings*. Journal of Trace Elementary Exploratory Medicine, 1997. **10**: p. 135-145.
162. Schilsky ML, Q.N., Volenberg I, Kabishcher V, Sternlieb I, *Spontaneous cholangiofibrosis in Long-Evans Cinnamon rats: a rodent model for Wilson's disease*. Laboratory Animal Science, 1998. **48**: p. 156-161.
163. Masuda R, M.Y., Motomichi S, Kimimaro D, Mori M, *High susceptibility to spontaneous development of hepatocellular carcinoma in LEC rats*. The LEC rat: a new model for hepatitis and liver cancer, ed. Y.M. Mori M, Takeichi N, Taniguchi N. 1991, Tokyo: Springer-Verlag.
164. Grompe M, *Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases*. Journal of Inherited Metabolic Diseases, 2001. **24**: p. 231-244.
165. Strom SC, F.R., Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP, *Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure*. Transplantation, 1997. **63**: p. 559-569.
166. Kato J, K.M., Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamaki S, Sawada N, Niitsu Y, *Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats*. Journal of Clinical Investigator, 1996. **98**: p. 923-929.

167. Irani AN, M.H., Slehria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S, *Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease*. *Molecular Therapy*, 2001. **3**: p. 302-309.
168. Tong JZ, S.S., Cassio D, Gauthier F, Alvarez F, *Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation*. *Biology of the Cell*, 1994. **81**: p. 77-81.
169. Schilsky ML, S.R., Sterlieb I, *Copper metabolism in the LEC rats, a rodent model of Wilson's disease*. *American Journal of Physiology*, 1994. **266**: p. G907-G913.
170. Schosinsky KH, L.H., Beeler MF, *Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride*. *Clinical Chemistry*, 1974. **20**: p. 1556-1563.
171. Gottwald E, M.O., Polten A, *Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100*. *Electrophoresis*, 2001. **22**: p. 4016-4022.
172. International Working Party, *Terminology of nodular hepatocellular lesions*. *Hepatology*, 1995. **22**: p. 983-993.
173. Oyamada M, D.K., Fujimoto Y, Takahashi H, Satoh MI, Mori M, Masuda R, Yoshida MC, Satoh K, Sato K, *Spontaneous occurrence of placental glutathione S-transferase-positive foci in the livers of LEC rats*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1988. **79**: p. 5-8.
174. Faa G, N.V., Demelia L, *Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease*. *Journal of Hepatology*, 1995. **22**: p. 303-308.
175. Hayashi M, K.T., Endoh D, Nakayama K, Arikawa J, Takazawa A, Okui T, *Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **276**: p. 174-178.
176. Tassabehji NM, V.J., Levenson CW, *Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human HepG2 cells*. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 2005. **230**: p. 699-708.
177. Harris ZL, G.J., *Genetic and molecular basis for copper toxicity*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1996. **63**: p. 836S-841S.
178. Shiono Y, H.H., Wakusawa S, Yano M, *Ultrastructural identification of iron and copper accumulation in the liver of a male patient with Wilson disease*. *Medical Electron Microscopy*, 2001. **34**: p. 54-60.
179. Ma Y, Z.D., Zawabata T, Kiriu T, Toyokuni S, Uchida K, Okada S, *Copper and iron-induced oxidative damage in non-tumor bearing LEC rats*. *Pathology International*, 1997. **47**: p. 203-208.
180. Cao XW, F.Z., Ding GS, *Effects of tacrolimus on proliferation, apoptosis, and fluorouracil sensitivity of liver cancer cell line of SMMC-7721*. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2005. **4**: p. 269-273.
181. Sakai M, M.H., Tashiro S, Okumura Y, Kido H, *Inhibitory effect of FK506 and cyclosporine A on the growth and invasion of human liver cancer cells*. *Journal of Medical Investigation*, 2004. **51**: p. 63-69.

182. Mannervik B, *The isoenzymes of glutathione transferase*. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1985. **57**: p. 357-417.
183. Cloutier AS, P.S., Renous R, Beaudin M, Martin SR, Alvarez F, Lallier M, *Apoptosis in Long-Evans Cinnamon rat hepatocytes involves Bcl-2 family genes*. 2006.
184. Nakayama N, K.H., Kobayashi N, Hamada JI, Ogiso Y, Itakura Y, Matsumoto K, Nakamura T, Koike T, Kuzumaki N, Takeichi N, *Hepatocyte growth factor and c-met expression in Long-Evans Cinnamon rats with spontaneous hepatitis and hepatoma*. Hepatology, 1996. **24**: p. 596-602.
185. Kinoshita T, H.S., Nakamura T, *Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991. **177**: p. 330-335.
186. Tsao MS, Z.H., Giaid A, Viallet J, Nakamura T, Morag P, *Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells*. Cell Growth and Differentiation, 1993. **4**: p. 571-579.
187. Matsumoto K, T.H., Hamanoue M, Kohno S, Kinoshita T, Nakamura T, *Identification and characterization of "injurin", an inducer of expression of the gene for hepatocyte growth factor*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1992. **89**: p. 3800-3804.