

La Superoxyde dismutase réduit la fibrose hépatique et l'hypertension portale de rats cirrhotiques

Recombinant human manganese superoxide dismutase reduces liver fibrosis and portal pressure in CCl4 cirrhotic rats

M Guillaume [1], A Rodriguez-Vilarrupla [2], J Gracia-Sancho [2], E Rosado [2], A Mancini [3], J Bosch [2], JC Garcia-Pagán [2]

1. Service d'hépatogastro-entérologie, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse

2. Laboratoire d'hémodynamique hépatique, Service d'hépatologie, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) et CIBERehd, Université de Barcelone, Espagne

3. Département de biologie moléculaire et oncogénèse virale, Istituto Nazionale dei Tumori de Naples, Naples, Italie

Mots clés

- ◆ Hypertension portale
- ◆ Dysfonction endothéliale
- ◆ Fibrose hépatique
- ◆ Cirrhose
- ◆ Résistance vasculaire intra-hépatique
- ◆ Stress oxydatif
- ◆ Anti-oxydants

Résumé

Objectifs. Dans la cirrhose, le stress oxydant joue un rôle majeur dans l'augmentation de la résistance intra-hépatique, premier facteur responsable de l'hypertension portale, en augmentant le tonus vasculaire intra-hépatique et en favorisant le dépôt de fibrose. Notre objectif était de tester l'utilisation d'une nouvelle isoforme recombinante humaine de Manganèse Superoxyde Dismutase (rMnSOD), puissant antioxydant intra et extracellulaire, comme nouvelle stratégie pour réduire l'hypertension portale de rats rendus cirrhotiques par inhalation de CCl4.

Méthodes. Après sept jours de traitement par rMnSOD (ip, n = 11) ou son placebo (n = 9), la Pression Artérielle Moyenne (PAM), la pression portale et le flux sanguin portal des rats ont été mesurés *in vivo*. La fonction endothéliale a été évaluée en *ex vivo*, par la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine, sur des foies isolés-perfusés. La fibrose était mesurée par coloration des coupes de foie au rouge Sirius et par l'expression de l' α -smooth muscle actin, un marqueur d'activation des cellules hépatiques étoilées.

Résultats. Le traitement par rMnSOD réduit considérablement la pression portale par la seule baisse de la résistance vasculaire du foie. Aucun retentissement hémodynamique systémique n'a été noté. Ces effets sont associés à l'amélioration de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine, mais aussi à la réduction significative des fibres de collagène et de l'expression de l' α -smooth muscle actin.

Conclusion. L'administration chronique de rMnSOD chez le rat cirrhotique réduit sélectivement la pression portale, la résistance vasculaire et la fibrose intra-hépatique, en améliorant la dysfonction endothéliale, ce qui suggère que ce nouvel antioxydant pourrait constituer un traitement complémentaire de l'hypertension portale dans la cirrhose.

Keywords

- ◆ Portal hypertension
- ◆ Hepatic fibrosis
- ◆ Cirrhosis
- ◆ Endothelial dysfunction
- ◆ Intrahepatic vascular resistance
- ◆ Oxidative stress
- ◆ Antioxidants

Abstract

Purpose. High oxidative stress within the cirrhotic liver plays a major role in increasing hepatic vascular resistance, the primary factor in the development of portal hypertension, and does so by facilitating liver fibrosis and increasing hepatic vascular tone. We aimed to investigate whether use of the novel isoform of recombinant human manganese superoxide dismutase (rMnSOD), which has the particular property of entering cells and exhibiting a potent intra and extracellular antioxidant activity, could be a new therapeutic strategy to reduce portal hypertension in CCl4 cirrhotic (CH) rats.

Methods. After treating CH rats with rMnSOD (i.p. 15 µg/kg/day, n = 11) or its vehicle (n = 9) for sept days, mean arterial pressure (MAP), portal pressure (PP) and portal blood flow (PBF) were measured. The vasodilatory response to acetylcholine was evaluated in isolated perfused livers precontracted with 0.1 M methoxamine, with liver sections being stained for fibrosis (Sirius red) and for hepatic stellate cell activation (α -smooth muscle actin).

Results. rMnSOD treatment significantly reduced PP (mean decrease 14 %) without significant changes in PBF, reflecting decreased hepatic vascular resistance. MAP was not modified. These effects were associated with a significant reduction in Sirius red staining and α -smooth muscle actin expression, as well as with improved vasodilatory response to acetylcholine.

Conclusions. Chronic rMnSOD administration reduces portal pressure, intrahepatic vascular resistance and liver fibrosis and improves hepatic endothelial dysfunction in cirrhotic rats, suggesting that it might constitute a new antioxidant to be considered as additional therapy for treating portal hypertension in cirrhosis.

Correspondance :

Maeva Guillaume - Service d'hépatogastro-entérologie, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, place du Docteur Baylac, Pavillon Dieulafoy, TSA 40031, 31059 Toulouse cedex 9 - E-mail : maevaguillaume31@gmail.com

Juan-Carlos Garcia-Pagán - Hepatic haemodynamic laboratory, liver unit, hospital clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain
E-mail : jcgarci@clinic.ub.es

L'augmentation de la résistance vasculaire intra-hépatique est le principal facteur responsable du développement de l'hypertension portale, principale complication de la cirrhose. Elle est le résultat non seulement des changements architecturaux du foie inhérents à la cirrhose, mais aussi d'une augmentation du tonus vasculaire hépatique (1-3). La dysfonction endothéliale sinusoidale, caractérisée par une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante, est un facteur pathogène majeur dans l'augmentation du tonus vasculaire. Elle est principalement le fait d'une biodisponibilité insuffisante en oxyde nitrique (NO) dans le foie cirrhotique. Le NO intra-hépatique est diminué en raison d'une diminution de la NO synthase (eNOS) (4-6) et d'une large destruction du NO par les ions superoxydes (O_2^-) (7). Notre groupe a préalablement montré que l'augmentation du contenu en O_2^- dans la cirrhose est la conséquence non seulement d'une production augmentée, mais aussi de la diminution de l'expression et de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD), principale enzyme antioxydante du foie (8).

Nous avons clairement démontré que les stratégies qui diminuent le niveau intra-hépatique d' O_2^- permettent, par l'amélioration de la biodisponibilité du NO intra-hépatique, de réduire la pression portale chez des rats cirrhotiques avec hypertension portale (9). Deux essais thérapeutiques réalisés dans notre laboratoire ont testé chez des rats cirrhotiques, la transfection d'adénovirus codant pour la SOD (10) et l'administration intra-portale de Tempol (une SOD mimétique) (11). Cependant, l'utilisation des thérapies géniques à base d'adénovirus est très controversée chez l'homme, et l'administration de Tempol a eu des effets systémiques en réduisant la pression artérielle moyenne.

Récemment, une nouvelle isoforme de Manganèse SOD recombinante humaine (rMnSOD) a été développée. La particularité de cette forme de SOD est sa capacité, après son administration systémique, de pénétrer dans les cellules grâce à sa séquence peptidique terminale non clivée (12-14). Elle a déjà montré son efficacité dans l'amélioration de conditions pathologiques associées à un stress oxydatif accru, par la destruction des ions O_2^- en intra et extracellulaire (15, 16). En outre, la rMnSOD présente une bonne biodistribution hépatique par rapport aux autres organes, ce qui suggère qu'elle serait bien adaptée pour corriger un stress oxydatif hépatique (13). La présente étude visait donc à déterminer si l'administration chronique de rMnSOD pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire l'hypertension portale dans la cirrhose.

Matériels et méthodes

Effets de la rMnSOD sur le niveau d'ions O_2^- intra-hépatique augmenté par la NADPH oxydase

Pour confirmer que la rMnSOD (produit dans le laboratoire du Dr Aldo Mancini, Istituto Nazionale dei Tumori di Napoli, Naples, Italie) (12-15) est capable de détruire un excès d'ions O_2^- intra-hépatique, des rats contrôles (non cirrhotiques) ont reçu une dose unique de rMnSOD (15 μ g/kg, ip) ou son placebo (phosphate buffer saline, PBS), deux heures avant l'expérience. Ensuite, les foies ont été isolés et perfusés, comme décrit ci-dessous, et le stress oxydatif a été généré par l'ajout de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH ; 1 mM ; Applichem, Darmstadt, Allemagne), le substrat de la NADPH oxydase, au système de perfusion tel que décrit précédemment (10). Après 10 minutes, les foies des rats ont été rapidement retirés et le contenu en O_2^- in situ a été évalué sur des coupes de foie frais (10 μ m, n = 4 par groupe) en utilisant le colorant dihydroéthidium (DHE, 10 μ M) (Molecular Probes Inc, Eugene, OR), comme décrit précédemment (7). Six images de fluorescence par coupe ont été obtenues

avec un microscope confocal à balayage laser (TCS-SL DMIRE2, Leica) et les analyses quantitatives ont été réalisées en utilisant Image J 1.43u software (National Institutes of Health (NIH), Etats-Unis).

Induction de la cirrhose et traitement par rMnSOD

Des rats mâles Wistar (pesant 50-75 g) ont subi une inhalation répétée par tétrachlorure de carbone (CCl_4). Du phénobarbital (0,3 g/L) a été ajouté à leur eau potable, comme décrit précédemment (17, 18). Après environ 12 à 16 semaines, les animaux ont développé de l'ascite et l'administration de CCl_4 et de phénobarbital a été interrompue. Une semaine plus tard, les animaux ont été randomisés et traités quotidiennement pendant sept jours par rMnSOD (15 mg/kg, ip) ou son placebo (PBS). La rMnSOD ou son placebo étaient préparés par une tierce personne. L'investigateur administrant le traitement et réalisant les expériences était donc en aveugle sur le traitement reçu par les rats, et le code a été gardé jusqu'à l'analyse finale des résultats. Les expériences ont été effectuées deux heures après la dernière injection de traitement. La dose utilisée de rMnSOD a démontré son efficacité dans la prévention du stress oxydatif dans d'autres pathologies (13-16). Les animaux étaient gardés dans un environnement contrôlé à l'IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Aóut Pi i Sunyer). Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité de protection et d'utilisation des animaux de laboratoire de l'Université de Barcelone et ont été menées conformément aux recommandations de la communauté européenne pour la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (directive CEE 86/609).

Détection de la rMnSOD par immunohistochimie

Pour confirmer que la rMnSOD est efficacement rentrée dans le foie des rats traités, une immuno-coloration de 5 coupes de foies incluses en paraffine à partir de chaque groupe a été réalisée avec un anticorps polyclonal de lapin produit par le Dr Mancini et spécifiquement dirigé contre sa séquence peptidique terminale non clivée, spécifique de la rMnSOD (12-14). En résumé, les coupes ont été traitées deux fois avec du PBS contenant du peroxyde d'hydrogène à 0,3 %, puis incubées avec l'anticorps primaire (1/100, 30 minutes, température ambiante). Les anticorps liés ont été visualisés en utilisant le diaminobenzidine comme chromogène, et les lames ont été ensuite colorées avec une solution d'hématoxyline pendant 10 minutes avant d'être montées et examinées au microscope optique (Zeiss Axiovert) pour une analyse qualitative (7). Pour le contrôle négatif, du PBS a été utilisé à la place de l'anticorps primaire.

Effets de la rMnSOD sur l'activité SOD hépatique et le stress oxydatif

L'activité totale de la SOD a été mesurée dans des homogénats de foie obtenus à partir de rats cirrhotiques traités par rMnSOD ou son placebo (n = 9 par groupe) en utilisant un dosage immunologique disponible dans le commerce (Sigma, Tres Cantos, Madrid). Le dosage est basé sur la réaction de compétition entre la SOD contenue dans l'échantillon et le sel de tétrazolium hautement soluble dans l'eau (WST) qui produit un colorant soluble dans l'eau, le formazan, par réaction avec O_2^- . Brièvement, les foies ont été homogénéisés dans un tampon contenant 20 mM d'HEPES, 1 mM d'EDTA, 210 mM de mannitol et 70 mM de saccharose. Après centrifugation à 1500 x g pendant cinq minutes à 4°C, le surnageant a été recueilli et la concentration en protéine a été quantifiée. Le dosage de l'activité SOD a été réalisé selon les instructions du fabricant.

Les niveaux d' O_2^- intra-hépatique ont été quantifiés à l'aide du dosage de l'activité SOD avec des modifications mineures. Brièvement, 20 μ g de protéines pour chaque échantillon de foie ($n = 7$ par groupe) ont été incubés avec le WST pendant 20 minutes à 37°C. Les contrôles internes positifs (enzyme exogène génératrice d' O_2^-) et négatifs (échantillons ayant une capacité antioxydante élevée) ont été inclus.

Etudes hémodynamiques *in vivo* (vidéo 1)

Les rats ont été anesthésiés avec une injection intra-péritonéale de kétamine (100 mg/kg, Merial, Barcelone, Espagne) et de midazolam (5 mg/kg, Laboratorio Reig Jofré, Barcelone, Espagne) et maintenu à une température constante de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant la chirurgie. Après trachéotomie avec un cathéter PE-240 (Portex, Kent, Royaume-Uni), des cathéters PE-50 (Portex) ont été introduits dans l'artère fémorale et la veine mésentérique supérieure pour mesurer respectivement, la pression artérielle moyenne (PAM, mmHg) et la pression portale (PP, mmHg) (19). Une sonde écho-doppler péri-vasculaire reliée à un débitmètre (Transonic Systems Inc, Ithaca, NY, Etats-Unis) a été placée autour de la veine porte aussi proche que possible de son origine (pour éviter le flux sanguin des collatérales) afin de mesurer le débit sanguin portal (DSP, mL/min). Les données hémodynamiques ont été recueillies après 20 minutes de stabilisation et enregistrées sur un ordinateur multi-canal basé sur l'enregistreur (PowerLab, 8SP) en utilisant le tableau 5.0.1 pour Windows software (Instruments AD, Mountain View, LA). La résistance vasculaire intra-hépatique (RVI) a été estimée que PP/DSP (mmHg/mL.min⁻¹).

Analyses biochimiques

À la fin de l'étude hémodynamique *in vivo*, des échantillons de sérum ont été prélevés dans l'artère fémorale pour évaluer ensuite l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'albumine, selon les protocoles standards.

Évaluation de la fonction endothéliale (vidéo 2)

Après les mesures hémodynamiques *in vivo*, les foies ont été rapidement isolés et perfusés par un système de perfusion à débit contrôlé, tel que décrit précédemment (6, 18). Après 20 minutes de stabilisation, la microcirculation intra-hépatique était préalablement vasoconstricte par l'adjonction de l'agoniste α 1-adrénérique méthoxamine (Mtx ; 10-4 mol/l ; Sigma) dans le réservoir. Après cinq minutes, la fonction endothéliale a été évaluée par la réponse vasodilatatrice à des doses cumulées d'acétylcholine (Ach, 10-7, 10-6, 10-5 mol/L ; Sigma) administrée toutes les 1,5 minutes. Les réponses à l'acétylcholine ont été calculées comme la variation en pourcentage de la pression de perfusion portale (PPP). Les critères de viabilité et de stabilité de la préparation de perfusion du foie sont l'aspect macroscopique du foie, une pression de perfusion stable, une production de bile de plus de 0,4 μ l/min/g de foie et un pH stable ($7,4 \pm 0,3$) du tampon de pendant les 20 minutes de stabilisation (18). Si un des critères de viabilité ou de stabilité n'étaient pas satisfaits, l'expérience était éliminée.

Effets de la rMnSOD sur la fibrose hépatique

Les foies de rats cirrhotiques traités par rMnSOD ($n = 8$) ou son placebo ($n = 8$) ont été fixés dans du formol à 10 %, inclus en paraffine, coupés et colorés avec 0,1 % de rouge Sirius pour les analyses semi-quantitatives de la fibrose hépatique (20-22). Huit images de chaque échantillon ont été obtenues à un

	Contrôle (n=9)	rMnSOD (n=11)	p
ASAT (U/L)	211 \pm 73	169 \pm 68	20
ALAT (U/L)	73 \pm 22	71 \pm 19	87
Albumine (g/L)	25,2 \pm 8	28,3 \pm 5	32

Tableau I. Effets du traitement par rMnSOD sur les fonctions hépatiques. Données présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. ASAT, aspartate aminotransférase ; ALAT, alanine aminotransférase. Vidéo I. Etude hémodynamique *in vivo* Vidéo II. Isolation et perfusion du foie *ex vivo*

grossissement x5 avec un microscope optique inversé (Zeiss Axiovert, Allemagne) équipé d'une caméra numérique, puis mesurées à l'aide du logiciel AxioVision. La surface colorée en rouge sur la superficie totale a été quantifiée en utilisant une méthode morphométrique.

Expression de l' α -smooth muscle actin (α -SMA)

L'expression de l' α -SMA hépatique a été déterminée par Western blot, comme décrit précédemment (23), à l'aide d'un anticorps primaire de souris anti- α -SMA (1/1 000, toute la nuit, 4°C ; Sigma), suivie d'une incubation avec un anticorps secondaire de lapin anti-souris HRP-conjugué (1 : 10 000 ; Stressgen, Victoria, BC, Canada). Les transferts ont été révélés par chémoluminescence. Les valeurs densitométriques quantitatives de l' α -SMA, déterminées à l'aide du Science Lab 2001 Image Gauge software (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf), ont été normalisées au glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Etats-Unis).

Statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées avec SPSS 19.0 pour Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées en utilisant le test t de Student ou les tests non paramétriques de Wilcoxon ou Mann-Whitney. La significativité a été fixée à un seuil de 0,05.

Résultats

Aucun rat n'est mort au cours de traitement. Il n'y avait pas de différences significatives entre les groupes en termes d'ASAT, ALAT ou de l'albumine (tableau 1).

La rMnSOD abolit les niveaux d'ions O_2^- promus par la NADPH oxydase dans les foies des rats contrôles (i.e. non cirrhotiques).

Les rats témoins prétraités avec une seule dose i.p. de rMnSOD deux heures avant l'activation du système de la NADPH/NADPH oxydase, ont des niveaux d'ions O_2^- intra-hépatique significativement réduits en comparaison à des rats prétraités avec le placebo (réduction de 87 %, $p < 0,0001$) (fig. 1), démontrant que la rMnSOD atteint le foie où elle est fonctionnellement active.

Détermination de la présence et de l'activité de la rMnSOD dans les foies de rats cirrhotiques

Les foies d'animaux cirrhotiques recevant la rMnSOD humaine ont montré une coloration positive pour la protéine, alors que cela n'a pas été observé chez les rats contrôles (fig. 2a). Pour évaluer si la rMnSOD intra-hépatique est capable de détruire les ions O_2^- intra-hépatiques, nous avons déterminé l'activité totale de la SOD dans les homogénats de foie. Comme prévu, l'activité totale de la SOD a été augmentée (+ 18 %, $p = 0,05$) [fig. 2b Gauche] dans les foies des rats cirrhotiques traités par la rMnSOD par rapport à ceux traités avec le placebo. Ceci est associée à une diminution des ions O_2^- dans les foies des rats

	Contrôle (n=9)	rMnSOD (n=11)	p
PP (mm Hg)	14.7 ± 1.7	12.6 ± 1.9	02
DSP (ml/min/100g pc)	2.9 ± 1.0	3.6 ± 1.1	21
RVI (mmHg/ml/min)	1.7 ± 0.7	1.0 ± 0.4	03
PAM (mm Hg)	87 ± 17	82 ± 21	58
FC (beat/min)	368 ± 43	351 ± 42	37
Poids corporel (g)	356 ± 57	361 ± 43	82

Tableau II. Effets du traitement par rMnSOD sur l'hémodynamique systémique, splanchnique et hépatique chez des rats cirrhotiques par CCl₄. Le traitement par rMnSOD réduit considérablement la PP (diminution moyenne de 14 %) et la RVI des rats cirrhotiques. Le poids corporel, le DSP et l'hémodynamique systémique (PAM et FC) étaient comparables entre les groupes.

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. PP, pression portale ; DSP, débit sanguin portal ; RVI, résistance vasculaire intra-hépatique ; MAP, pression artérielle moyenne ; FC, fréquence cardiaque.

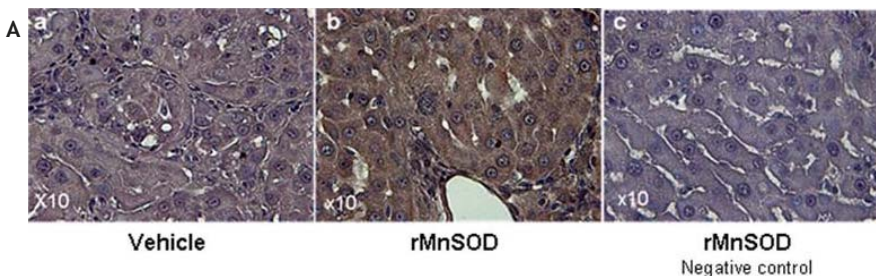
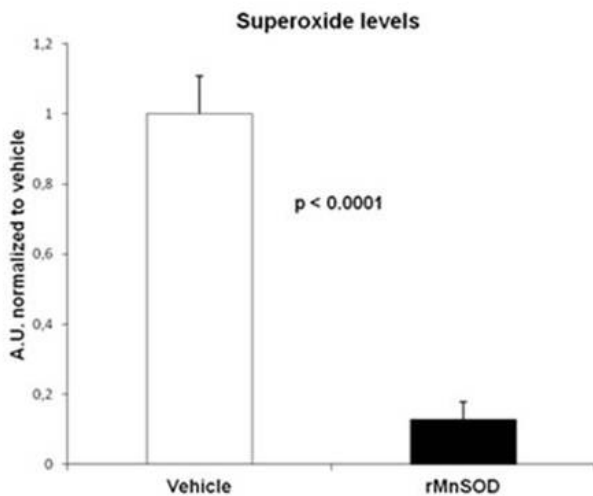
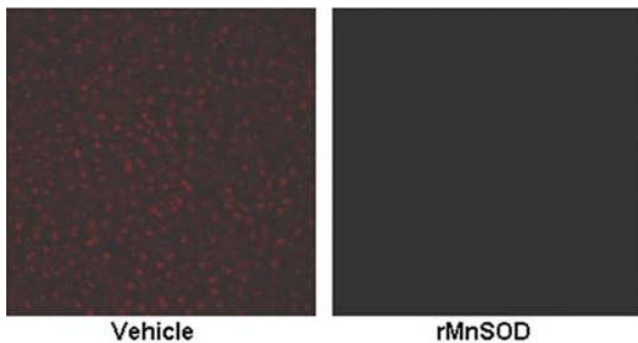
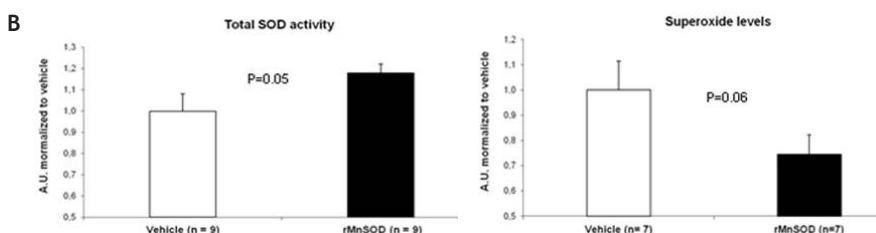


Figure 2 - Comparaison de rats cirrhotiques traités par rMnSOD ou par placebo.

A. Images histologiques représentatives des foies de rats cirrhotiques traités par rMnSOD ou placebo après la réaction immuno-histochimique avec un anticorps spécifique contre la séquence peptidique terminale non clivée spécifique de la rMnSOD (grossissement original x10). La présence de rMnSOD a été détectée par une coloration brune dans l'espace interstitiel du foie et dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules endothéliales. Absence de réaction en bleu, comme indiqué dans le contrôle négatif.

B Gauche. La SOD totale déterminée dans les homogénats de foie de rats cirrhotiques traités par rMnSOD ou placebo (18 % d'augmentation ; $p = 0,05$).

B Droite. Les niveaux d'ions superoxydes étaient significativement diminués dans le foie des rats traités par rMnSOD (26 % de baisse ; $p = 0,06$). Les données sont exprimées en unités arbitraires (UA) normalisés au contrôle ± erreur standard à la moyenne. SOD ; Superoxyde dismutase totale.



cirrhotiques traités avec la rMnSOD comparé au placebo (baisse de 26 %, $p = 0,06$) [fig. 2b Droite].

La rMnSOD réduit la pression portale et la résistance vasculaire intra-hépatique chez les rats cirrhotiques

Les rats cirrhotiques traités par la rMnSOD avaient significativement des pressions portales plus faibles que ceux recevant le placebo ($12,6 \pm 1,9$ mmHg dans le groupe rMnSOD vs $14,7 \pm 1,7$ mmHg dans le groupe contrôle ; soit une diminution moyenne de 14 %, $p = 0,022$), sans qu'il y ait de différence significative dans la MAP ou le débit sanguin portal. La réduction de la PP était associée à une diminution significative de la résistance vasculaire intra-hépatique (tableau 2).

La rMnSOD améliore la dysfonction endothéliale hépatique chez le rat cirrhotique

La pression basale de perfusion portale était significativement plus faible chez les rats traités par rMnSOD comparé aux rats contrôles ($7,9 \pm 2,1$ mmHg pour la rMnSOD contre $10,1 \pm 1,6$ mmHg pour le placebo ; soit une diminution moyenne de 21 %, $p = 0,032$). Comme prévu, les foies cirrhotiques traités par le placebo montraient une dysfonction endothéliale marquée. Le traitement par rMnSOD a significativement amélioré la vasorelaxation en réponse à l'Ach (fig. 3).

La rMnSOD diminue la fibrose hépatique chez les rats cirrhotiques

Les foies d'animaux cirrhotiques recevant le placebo exposé présentaient une architecture désorganisée, avec un dépôt étendu de collagène fibrillaire et de petits nodules de régénération (fig. 4a Haut). Les foies de rats recevant la rMnSOD avaient une réduction de 51,8 % du dépôt de collagène ($p < 0,0001$) [fig. 4a Bas], résultant en septas plus fins, et en nodules de régénération plus gros, par rapport aux rats con-

Figure 1 - Comparaison rats témoins traités et placebo.

Haut. Images de microscopie confocale à fluorescence représentatives de la détection *in situ* d' O_2^- par le dihydroéthidium (DHE) sur des coupes de foie frais de rats témoins traités avec une injection ip de rMnSOD ou du placebo en réponse à la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Bas. L'analyse de l'intensité de la fluorescence a montré une réduction marquée et significative des O_2^- intra-hépatiques chez les rats témoins traités par rMnSOD (réduction de 87 % par rapport à des rats traité avec le placebo ; $p < 0,0001$). Les données sont présentées en unités arbitraires (UA) normalisés au contrôle ± SEM.

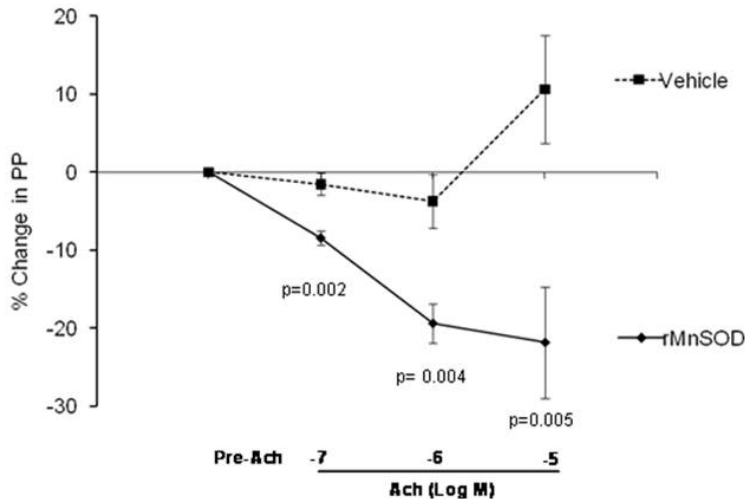


Figure 3 - Effet du traitement par rMnSOD sur la fonction endothéliale de rats cirrhotiques.

Vasorelaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine (ACh) dans le foie isolé et perfusé de rats cirrhotiques traités par rMnSOD (n = 10) ou placebo (n = 8). Les résultats sont exprimés en variation de pourcentage de PP en réponse à l'ACh et sont présentés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Le traitement par rMnSOD améliore considérablement la réponse vasodilatatrice à l'ACh dans les foies de rat cirrhotiques. PP, pression de perfusion portale.

trôles (fig. 4a Haut). Ce résultat était associé à une diminution marquée de l'expression de l' α -SMA, un marqueur d'activation des cellules étoilées du foie (76 % de moins d' α -SMA exprimée que dans les foies de rats contrôles ; $p = 0,012$) [fig. 4b]. Tous ces résultats confirment que le traitement par rMnSOD réduit nettement l'activation des cellules hépatiques étoilées et la fibrose hépatique.

Discussion

L'augmentation de la résistance intra-hépatique dans le foie cirrhotique, principale cause de l'hypertension portale, est principalement due à des perturbations architecturales couplées à l'augmentation du tonus vasculaire lié à la dysfonction endothéliale (1-3). La faible biodisponibilité du NO et la production exacerbée de vasoconstricteurs sont considérés comme les principaux facteurs responsables de la dysfonction endothéliale. De même que la fibrose hépatique, ils représentent les cibles thérapeutiques les plus évidentes pour améliorer l'hypertension portale (9). En effet, comme le stress oxydatif élevé dans le foie cirrhotique est l'un des mécanismes conduisant à la fois à la fibrose hépatique, et à la réduction de la disponibilité du NO (7), plusieurs tentatives ont été faites pour réduire le stress oxydatif hépatique dans des modèles animaux cirrhotiques. Ces études ont démontré que l'augmentation de l'activité de la SOD, soit par transfection d'adénovirus codant pour la SOD (10) soit par l'administration d'une SOD mimétique (Tempol) (11), augmente efficacement

la biodisponibilité du NO intra-hépatique et réduit la pression portale. Toutefois, des limites claires liées à l'usage controversé de la thérapie génique chez l'homme, ainsi que les effets systémiques de l'administration du Tempol, diminuent le potentiel d'application de cette approche dans un contexte clinique.

Récemment, une nouvelle isoforme de MnSOD humaine a été identifiée. Contrairement à la forme mitochondriale sauvage de MnSOD, cette protéine recombinante possède les propriétés particulières de pénétrer dans les cellules lorsqu'elle est injectée dans la circulation systémique (12-14) et se localiser dans le foie, ce qui suggère qu'elle aurait pour effet de corriger le stress oxydatif hépatique par une destruction à la fois intra et extracellulaire d' O_2^- (12-16).

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'administration chronique de rMnSOD aux animaux cirrhotiques pourrait diminuer le stress oxydatif hépatique, améliorer la résistance intra-hépatique vasculaire et enfin diminuer la pression portale.

Pour valider notre hypothèse, nous avons tout d'abord caractérisé la distribution de rMnSOD et son activité dans le foie après son injection systémique. Les résultats de ces expériences ont démontré que l'administration aiguë intrapéritonéale de rMnSOD aux rats contrôles non cirrhotiques résulte en une réduction marquée du stress oxydatif hépatique généré expérimentalement par l'activation du système NADPH-oxydase, confirmant sa biodistribution dans le foie et la préservation de son activité enzymatique.

Plus important encore, après l'administration chronique de rMnSOD aux animaux cirrhotiques, nous avons démontré sa

Figure 4 - Effets du traitement par rMnSOD sur la fibrose intra-hépatique de rats cirrhotiques.

Haut. Les images histologiques des foies colorés au rouge Sirius à partir de rats cirrhotiques traités par la rMnSOD ou le placebo. Les coupes représentatives figurent à un grossissement x5.

Bas. Effets du traitement par rMnSOD sur la fibrose intra-hépatique de rats cirrhotiques.

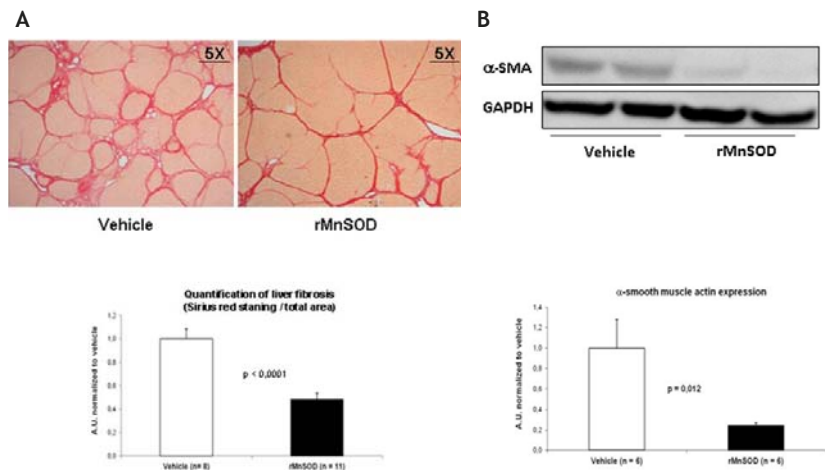
La quantification de la fibrose hépatique (aire de coloration au rouge Sirius sur aire totale) par la moyenne de 8 images de chaque coupe.

B Haut. Expression de l' α -SMA.

Représentation de l'analyse Western blot de l' α -SMA des foies de rats traités par rMnSOD ou placebo.

B Bas. Expression de l' α -SMA.

Quantifications densitométriques en unités arbitraires (UA) normalisées à la GAPDH. Le traitement par rMnSOD réduit considérablement le collagène fibrillaire intra-hépatique (51,8 %, $p < 0,0001$) et l'expression de l' α -SMA (76 %, $p = 0,012$), un marqueur de l'activation des cellules étoilées hépatiques. Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne normalisée au contrôle.



présence dans le foie, qui a conduit à augmenter l'activité hépatique de la SOD et diminuer de manière efficace des niveaux élevés d'O₂⁻. Ceci indique que la rMnSOD peut représenter une nouvelle option thérapeutique pour les maladies du foie dans laquelle l'augmentation du stress oxydatif joue un rôle pathogène (12-14).

Une fois que l'agent thérapeutique a été validé dans notre modèle expérimental, les effets possibles de la rMnSOD sur l'hémodynamique hépatique et systémique ont été analysés. Notre étude démontre clairement que la rMnSOD réduit considérablement la pression portale *in vivo*, sans modifier l'hémodynamique systémique ou splanchnique. L'ampleur de la réduction moyenne de 14 % de la pression portale, est la réduction la plus marquée en pression portale observée dans l'utilisation des stratégies antioxydantes chez les rats cirrhotiques (10,11,24,25). La diminution de la PP n'a pas été associée à des changements dans le flux sanguin portal, suggérant ainsi une réduction significative de la résistance vasculaire hépatique.

Pour identifier les mécanismes d'amélioration de la résistance intra-hépatique liée à la rMnSOD, nous avons caractérisé l'état de fibrose hépatique et la fonction hépatique endothéliale. La fibrose hépatique a été étudiée par l'analyse de la teneur en collagène fibrillaire et l'expression de l' α -SMA, un marqueur de l'activation des cellules hépatiques étoilées. Nous avons observé que les rats traités par rMnSOD présentaient une diminution marquée de collagène fibrillaire hépatique (baisse moyenne de 51,8 %), résultant en nodules de régénération plus gros, avec des *septas* plus fins, par rapport aux rats traités avec le placebo. Il est important de souligner qu'une épaisseur plus importante du septum et une plus petite taille des nodules sont associés à un degré plus sévère d'hypertension portale (26). En outre, le traitement par rMnSOD réduit significativement l'expression de l' α -SMA (diminution moyenne de 76 %). Ces résultats indiquent clairement un effet anti-fibrosant et sont conformes aux données de la littérature montrant la protection des hépatocytes et l'atténuation de la fibrose par désactivation des cellules étoilées du foie par des antioxydants (27).

En plus de l'amélioration des modifications architecturales du foie, l'administration de rMnSOD a considérablement amélioré la dysfonction endothéliale hépatique. En effet, la vasoconstriction paradoxale bien connue des foies cirrhotiques en réponse à des doses croissantes d'acétylcholine, n'était plus observée chez les animaux traités par la rMnSOD. Ces effets bénéfiques de rMnSOD sur la fonction hépatique endothéliale pourrait être liés à l'amélioration de la disponibilité du NO associée à une réduction des O₂⁻, comme précédemment démontré par notre groupe et d'autres (7, 10, 11, 24, 25). Cependant, il est également concevable que l'amélioration de la fibrose du foie peut également avoir contribué à la reprise de la fonction endothéliale.

Il est à noter que, contrairement à ce qui s'est passé avec l'administration du Tempol (11), la rMnSOD n'a pas diminué la pression artérielle systémique, ce qui représente un net avantage de cette stratégie actuelle dans le traitement de l'hypertension portale cirrhotique.

Conclusion

L'étude actuelle démontre que l'administration chronique de rMnSOD à des rats cirrhotiques diminue considérablement la résistance vasculaire hépatique, à la fois en améliorant la fibrose du foie et par l'amélioration de la dysfonction endothéliale, conduisant ainsi à une réduction significative de la pression portale. Notre étude suggère que la rMnSOD peut représenter un agent utile dans le traitement des patients atteints de cirrhose du foie.

α -SMA : α -smooth muscle actin

Ach : Acetylcholine

UA : Unité arbitraire

CCL4 : Tétrachlorure de carbone

DHE : Dihydroethidium

H&E : Hématoxyline et éosine

HRP : Horseradish peroxidase

RVI : Résistance vasculaire intra-hépatique

PAM : Pression artérielle moyenne

Mtx : Methoxamine

NO : Oxyde nitrique

O₂⁻ : Ion superoxyde

DSP : Débit sanguin portal

PP : Pression portale

PPP : Pression de perfusion portale

rMnSOD : Recombinant human manganese-containing superoxide dismutase

SOD : Superoxide dismutase

Références

- Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141-56.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis. *J Hepatol* 2007 ;46:927-34.
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006;43:121-31.
- Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.
- Shah V, Toruner M, Haddad F, et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-8.
- Gupta TK, Toruner M, Chung MK, et al. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-31.
- Gracia-Sancho J, Lavina B, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology* 2008;47:1248-56.
- Van de Casteele M, Van Pelt JF, Nevens F, et al. Low NO bioavailability in CCL4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003;2:2.
- Bosch J, Abralde JG, Fernandez M, et al. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-67.
- Lavina B, Gracia-Sancho J, Rodriguez-Vilarrupla A, et al. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCL4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009;58:118-25.
- Garcia-Caldero H, Rodriguez-Vilarrupla A, Gracia-Sancho J, et al. Tempol administration, a superoxide dismutase mimetic, reduces hepatic vascular resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2010;54:660-5.
- Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, et al. The leader peptide of a human rec. MnSOD as molecular carrier which delivers high amounts of Cisplatin into tumor cells inducing a fast apoptosis *in vitro*. *Int J Cancer* 2011;128:453-9.
- Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, et al. Biophysical and biochemical characterization of a liposarcoma-derived recombinant MnSOD protein acting as an anticancer agent. *Int J Cancer* 2008;123:2684-95.
- Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, et al. Tumor suppressive activity of a variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int J Cancer* 2006;119:932-43.
- Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, et al. A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. *Free Radic Biol Med* 2009;46:110-6.
- Rahman NA, Mori K, Mizukami M, et al. Role of peroxynitrite and recombinant human manganese superoxide dismutase in reducing ischemia-reperfusion renal tissue injury. *Transplant Proc* 2009;41:3603-10.
- Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abralde JG, et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance

- of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003;37:172-81.
18. Graupera M, Garcia-Pagan JC, Titos E, et al. 5-Lipoxygenase Inhibition Reduces Intrahepatic Vascular Resistance of Cirrhotic Rat Livers: A Possible Role of Cysteinyl-Leukotrienes. *Gastroenterology* 2002;122:387-93.
 19. Castaneda B, Bernardi-Venon W, Bandi JC, et al. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2000;31:581-6.
 20. Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats. *Hepatology* 2009;49:1245-56.
 21. Trebicka J, Hennenberg M, Odenthal M, et al. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010;53:702-12.
 22. Rodriguez-Vilarrupla A, Lavina B, Garcia-Caldero H, et al. PPAR α activation improves endothelial dysfunction and reduces fibrosis and portal pressure in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2012;56:1033-9.
 23. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, et al. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007;46:1208-17.
 24. Yang YY, Lee KC, Huang YT, et al. Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2008;49:25-33.
 25. Yang YY, Lee TY, Huang YT, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) determines the improvement of hepatic endothelial dysfunction by vitamin E in cirrhotic rats. *Liver Int* 2012;32:48-57.
 26. Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, et al. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis-a histological classification of the severity of cirrhosis. *J Hepatol* 2006;44:111-7.
 27. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.