

# IDENTIFICATION DES MECANISMES MOLECULAIRES DE L'HEPATOPROTECTION DU FOIE DE RAT ISOLE

**Thèse présentée par Bérengère Papegay**  
en vue de l'obtention du grade académique de Docteur en Sciences (ULB)  
et en Biologie et Santé (Université de Lille Nord de France)  
Année académique 2020-2021

Sous la direction de la Professeure Véronique Kruys, promotrice  
(Université libre de Bruxelles)

et du Professeur Joseph Vamecq , promoteur  
(Université de Lille Nord de France)

## **Composition du Jury**

*Président* : Pr Luc Vanhamme  
*Secrétaire* : Pr Anna-Maria Marini  
*Directrice de thèse* : Pr Véronique Kruys  
*Directeur de thèse* : Pr Joseph Vamecq  
*Examineurs* : Pr Adelin Albert  
Pr Mustapha Cherkaoui Malki  
*Experts extérieurs/ rapporteurs* : Pr Alain Leon  
Pr Pierre Andreoletti  
*Président du comité d'accompagnement* : Pr Oberdan Leo

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier le Professeur Jean Boogaerts, Professeur de l'Université libre de Bruxelles, Chef de service d'anesthésiologie au CHU Marie Curie de Charleroi sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Son implication dans la compréhension des mécanismes moléculaires et biochimiques de notre pratique quotidienne de médecin clinicien m'a permis d'ouvrir une réflexion à un champ plus fondamental de ma profession.

Je souhaite remercier le Professeur Véronique Kruys de la faculté des Sciences de l'Université Libre de Bruxelles pour son soutien permanent ainsi que le Professeur Joseph Vamecq de l'Inserm, Faculté de Médecine de l'Université de Lille pour le suivi des expérimentations et pour son savoir infini.

Je remercie également les membres de *mon comité d'accompagnement* :

Le Professeur Adelin Albert du Service de Biostatistique du CHU de Liège et du Département des Sciences de la Santé publique de l'Université de Liège pour son suivi statistique rapproché.

Le Professeur Mustapha Cherkaoui-Malki de la Faculté de la Vie de la Terre et de l'Environnement de l'Université de Bourgogne.

Le Professeur Oberban Leo de la Faculté des Sciences de l'Université libre de Bruxelles et président du comité d'accompagnement.

Je remercie les collaborateurs qui m'ont aidé à réaliser ce projet :

Madame Laurence Seidel du Service de Biostatistique du CHU de Liège pour ses études statistiques remarquables.

Monsieur Vincent Nuyens, technicien de laboratoire du Laboratoire expérimental du CHU de Charleroi.

Madame Magali Vael et Mme Termini Laryssa, secrétaires du service d'anesthésiologie du CHU de Charleroi.

Les laboratoires de l'IBMM et de l'INSERM et leurs collaborateurs qui m'ont appris de nombreuses techniques de laboratoire qui m'étaient peu connues.

Je remercie également mon mari et mes enfants qui m'ont soutenu au quotidien dans ce projet.

# RÉSUMÉ DE THÈSE

## Résumé de la thèse en français

Les mécanismes moléculaires de l'hépatoprotection du foie isolé de rat sont explorés. Un premier travail souligne l'importance du coût énergétique de cette protection en la corrélant à une charge énergétique nécessitant le dépassement d'un seuil en deçà duquel la protection s'estompe. Un second set de travaux basés sur l'administration de substrats énergétiques (lactate et alanine) confirme le besoin énergétique de l'hépatoprotection. Un troisième travail montre que l'accroissement de la durée du jeûne du rat donneur de 18 à 24 heures et, plus globalement, la capacité de mobilisation énergétique et, à ce titre, l'autophagie sont hépatoprotecteurs. Un quatrième travail identifie les acteurs et voies de signalisation responsables de la protection autophagique du foie isolé: l'ADP et le récepteur P2Y13. Cet éclairage de l'hépatoprotection (mobilisation énergétique, autophagie) et de sa signalisation (ADP, récepteur P2Y13) ouvrent des perspectives thérapeutiques innovantes des maladies du foie et stratégies nouvelles de préservation du greffon hépatique.

## Summary of the thesis in English

Molecular underlying mechanisms of hepatoprotection are explored as regards to isolated rat liver. A first work highlights the energetic cost of this protection by correlating it to an energetic charge that requires the exceeding of a threshold below which protection fades. A second set of studies based on supplementing so-called energetic substrates (lactate and alanine) strengthens the conclusion for the energy requirement of hepatoprotection. A third work shows that the increase of fasting period of the donor rat from 18 to 24 hours and, more globally, capacity for energy mobilisation and, as such, autophagy are hepatoprotective. A fourth work identifies the actors and signalling pathways responsible for the autophagic protection of the isolated liver: ADP and the purinergic P2Y13 receptor. This insight into hepatoprotection (energy mobilisation, autophagy) and its signalling (ADP, P2Y13 receptor) opens up innovative therapeutic prospects for liver diseases and new strategies for improving preservation of the liver graft.

## RÉSUMÉ DE THÈSE

L'effet protecteur du jeûne a été observé dans plusieurs domaines de la santé. Pour l'étudier, un modèle de foie de rat perfusé *ex vivo* a ici été utilisé. Dans ce modèle, nous n'avons pas observé, pour un jeûne de 18h, l'effet protecteur du jeûne rapporté pour le foie *in situ*. Nous avons cependant souligné l'importance du coût énergétique du mécanisme protecteur du foie isolé soumis au stress expérimental de l'ischémie/reperfusion et corrélé la protection à un taux plus élevé de glycogène et une charge énergétique nécessitant le dépassement d'un seuil en deçà duquel la protection s'estompait. L'administration de substrats énergétiques (lactate et alanine) nous a permis de confirmer le besoin énergétique de la protection du foie isolé. Ensuite, l'accroissement de la durée du jeûne du rat donneur de 18 à 24 heures s'est avérée hépatoprotectrice et, plus globalement, a montré que la capacité de mobilisation énergétique et, à ce titre, l'autophagie contribuaient à l'hépatoprotection, le coût énergétique bien connu de l'autophagie étant en adéquation avec les précédents travaux du doctorat. Trois voies de signalisation candidates pour l'activation de l'autophagie, impliquant AMPK, HMGB1 et ADP, ont été étudiées. La phosphorylation de l'AMPK était augmentée dans le foie de rat à jeun 24h vs 18h. Toutefois, l'ajout d'AICAR, un activateur de l'AMPK, bien qu'augmentant sa phosphorylation dans le foie isolé de rat à jeun 18h, n'a pas induit de protection. L'accumulation d'HMGB1, connue pour induire l'autophagie, n'a montré aucune corrélation avec les marqueurs de la cytolyse hépatique (LDH) et de l'autophagie (rapport LC3II/Actine). L'ADP, dans ses rapports  $ADP/(AMP+ADP+ATP)$  et  $ADP/(AMP+ATP)$ , était plus élevée pour les foies de rat à jeun 24h et a été corrélée à l'hépatoprotection. L'ADP induisant l'autophagie par activation du récepteur membranaire P2Y13, un inhibiteur spécifique, le MRS2211, a été utilisé. Son inclusion dans le perfusât a estompé l'hépatoprotection et l'activation de l'autophagie associées au prolongement de la période de jeûne, validant le rôle-clé de cette signalisation dans l'hépatoprotection.

En conclusion, le doctorat a permis une avancée substantielle de la compréhension du rôle joué par le statut nutritionnel du sujet donneur sur l'hépatoprotection du foie isolé. L'identification des mécanismes moléculaires de l'hépatoprotection (mobilisation énergétique, autophagie) et de sa signalisation (ADP, récepteur P2Y13) ouvrent des perspectives thérapeutiques innovantes des maladies du foie et de nouvelles stratégies de préservation du greffon hépatique. Dans une optique de survie cellulaire, l'autophagie assure à la fois une fonction de maintien de la qualité des composants cellulaires et un rôle énergétique. Ce maintien de qualité protège la cellule, elle coûte en énergie rendant cette dernière indispensable à ce type de protection. Autrement dit, la maintenance préserve de la détérioration et cette protection a un coût qui passe par une signalisation (décision interne de financement) qui, identifiée, peut désormais être sollicitée comme souhaité. Aussi, un financement externe (apport de substrats énergétiques) peut être choisi voire ajouté au précédent.

## ABSTRACT ON THE THESIS

The protective effect of fasting has been observed in several areas of health. To study it, a rat liver model perfused *ex vivo* was used here. In this model, we did not observe, for an 18h fasting, the protective effect reported for the liver *in situ*. However, we did emphasize the importance of the energy cost of the protective mechanism in the isolated liver under experimental stress of ischemia/reperfusion and correlated protection with higher glycogen levels and an energy load that required an exceeding threshold below which protection fades. The administration of energy substrates (lactate and alanine) allowed us to confirm the energetic need for protection of the isolated liver. Then, increasing the duration of fasting of the donor rat from 18 to 24 hours proved to be hepatoprotective and, more generally, showed that the capacity for energy mobilization and, as such, autophagy contributed to hepatoprotection, the well-known energy cost of autophagy being in line with previous PhD work. Three candidate signaling pathways for the activation of autophagy, involving AMPK, HMGB1 and ADP, were studied. Phosphorylation of AMPK was increased in fasted rat liver 24 hours vs. 18 hours. However, the addition of AICAR, an activator of AMPK, although increasing its phosphorylation in isolated fasted rat liver 18h, did not induce protection. HMGB1 accumulation known to induce autophagy, showed no correlation with markers of hepatic cytolysis (LDH) and autophagy (LC3II/Actin ratio). ADP, in its ADP/(AMP+ADP+ATP) and ADP/(AMP+ATP) ratios, was higher in 24-hour fasted rat livers and was correlated with hepatoprotection. ADP induced autophagy by activation of the membrane P2Y13 receptor, a specific inhibitor, MRS2211, was used. Its inclusion in the perfusate blunted the hepatoprotection and activation of autophagy associated with prolonged fasting, validating the key role of this signaling in hepatoprotection.

In conclusion, the Ph.D. allowed a substantial advance in the understanding of the role played by the nutritional status of the donor on the hepatoprotection of the isolated liver. The identification of the molecular mechanisms of hepatoprotection (energy mobilization, autophagy) and of its signaling (ADP, P2Y13 receptor) opens up innovative therapeutic perspectives for liver diseases and new strategies for liver graft preservation. From a cell survival perspective, autophagy ensures both a function of maintaining the quality of cellular components and an energetic role. This maintenance of quality protects the cell and costs energy, making it indispensable for this type of protection. In other words, the maintenance preserves from deterioration and this protection has a cost that goes through signalling (internal funding decision) which, once identified, can now be requested as desired. Also, external financing (contribution of energy substrates) can be chosen or even added to the previous one.

## ABREVIATIONS

Acétyl-CoA: acétyl-coenzyme A  
 ADP : adénosine bisphosphate  
 AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide  
 Akt: protéine kinase B  
 ALT : alanine amino transférase  
 AMP : adénosine monophosphate  
 AMPK: AMP-activated protein kinase  
 AST : aspartate amino transférase  
 ATF2: activating transcription factor 2  
 ATG : autophagy related gene  
 Atg : autophagy related protein  
 Atg6 (levures) = Bécline 1  
 Atg8 (levures) = LC3  
 Atg 1 (levures) = ULK1/2: uncoordinated 51-like kinase 1/2  
 Atg 17 = FIP 200 (200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein)  
 ATP: adénosine triphosphate  
 Bad: Bcl2 antagonist of cell death  
 Bax: Bcl2 associated X protein  
 BBD: Bcl2 binding Domain  
 Bcl2: Bécline 2  
 Bcl-XL: B-cell lymphoma extra-large  
 BNIP3: Bcl2/adenovirus E1B protein-interacting protein 3  
 CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium  
 CE : charge énergétique  
 CRP: protéine C réactive  
 Cul 3: cullin 3  
 DAPK: death-associated protein kinase  
 DAMP: damage-associated molecular pattern  
 DEP: zone d'interaction avec mTOR  
 DFCP1: double-FYVE-containing protein 1  
 EDTA : éthylène diamine tétraacétique  
 E2F1: E2F transcriptor factor  
 eIF2 $\alpha$ : eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$   
 ERK: extracellular regulated protein kinase  
 FADD: Fas associated protein with death domain  
 Foxo: Fork headbox protein  
 GABARAP : gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein  
 GLUT : transporteurs de glucose à diffusion facilitée  
 G-6-P: glucose-6-phosphate  
 GTP: guanosine triphosphate  
 HBA1C: hémoglobine glycatée fraction A1C  
 HDL: lipoprotéine de haute densité  
 HSPA8 : heat shock protein family A member 8  
 HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazine éthane sulfonique  
 HIF-1: hypoxia inducible factor-1  
 HMGB1: high mobility group box 1  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
 HPLC : chromatographie liquide haute performance  
 HRP : horseradish peroxydase  
 IGLF-1: insulin-like growth factor-1  
 IL-1: interleukine-1

IL-6: interleukine-6  
 IMPase: inositol monophosphatase  
 IP3: inositol triphosphate  
 IRS1: insulin receptor substrate 1  
 JNK: c-Jun N-terminal kinase  
 K : potassium  
 KCl: chlorure de potassium  
 kDa: kilodalton (kg/mole)  
 Keap: Kelch-like ECH associated protein 1  
 KFERQ: lys-Phe-Glu-Arg-Gln  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : phosphate de monopotassium  
 KOH : hydroxyde de potassium  
 LAMP2A: lysosomal-associated membrane protein 2 splicing isoform A  
 LC3II : microtubule-associated protein light chain 3  
 LDH : Lactate déshydrogénase  
 LDL: lipoprotéine de basse densité  
 LKB1: liver kinase B1  
 LPL: lipoprotéine lipase  
 3MA : 3 méthyladénine  
 MAMPs: mitochondria associated membranes  
 MAPK: mitogen activated protein kinase  
 MAP1LC3-PE: microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3-phosphatidylethanolamine  
 mLST8 : mammalian lethal with Sec13 protein 8  
 mTOR: mammalian target of rapamycine  
 NaCl : chlorure de sodium  
 NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
 NADH: nicotinamide adénine dinucléotide  
 NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease  
 NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium  
 NaHPO<sub>4</sub> : hydrogénophosphate de sodium  
 NaOH: hydroxyde de sodium  
 NGF: nerve growth factor  
 NF-κB: nuclear factor kappa B  
 Nrf2: nuclear factor erythroïd 2  
 OAA : oxaloacétate  
 p62 : protéine p62  
 PAS : acide périodique schiff  
 PE: phosphatidyléthanolamine  
 PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase  
 PERK: endoplasmic reticulum kinase  
 PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase  
 PIP3: phosphatidylinositol 3 phosphate  
 PKD1 : protéine kinase dépendante du phosphoinositide  
 PRAS40 : proline-rich Akt substrate of 40kDa  
 PtdIns3K: phosphatidylinositol 3 kinase  
 PtdIns3P: phosphatidylinositol 3-phosphate  
 PTEN: phosphatase and TENSin homolog  
 Rab7: Ras related protein  
 RANKL: receptor activator of NF-κB  
 RB1CC1: RB1-inducible coiled-coil1  
 RE : reticulum endoplasmique  
 RHEB: Ras homolog enriched in brain  
 ROS: reactive oxygen species  
 SD : écart-type (standard deviation)  
 SE : erreur type (standard error)

SGLT: transporteurs Na-glucose  
siRNA: small interfering RNA  
Sirt1: silent information regulator 1  
S6K: S6 kinase  
SQSTM1: séquestrome 1  
TFEB: facteur de transcription EB  
TG: triglycérides  
TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$   
TORC: target of rapamycin complexe  
TRAF6: TNF-receptor-associated factor 6  
TSC1/2: tuberous sclerosis complexe 1/2  
TRAIL: TNF related apoptosis inducing ligand  
UBA: ubiquitinated-associated domaine  
UGT : uridine diphosphate glucuronyltransferase  
USB : ubiquine spécifique peptidase  
VLDL: lipoprotéine de très basse densité  
Vps: vacuolar protein sorting  
Vps15 (levures) = p150  
WIPI : WD-repeat domain PtdIns (3)-interacting family protein, homologue levure= Atg8

# TABLE DES MATIÈRES

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ DE THÈSE .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT ON THE THESIS .....</b>	<b>5</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE 1 : LE JEÛNE.....</b>	<b>15</b>
1.1. LA DÉFINITION DU JEÛNE .....	15
1.2. LES DIFFÉRENTS TYPES DE JEÛNE.....	15
1.2.1. <i>Le jeûne pré-anesthésique</i> .....	15
1.2.2. <i>Le jeûne total</i> .....	15
1.2.3. <i>Le jeûne continu</i> .....	15
1.2.4. <i>Le jeûne intermittent ou jeûne alterné</i> .....	15
Le jeûne jour-alterné.....	15
La restriction énergétique intermittente .....	15
L'alimentation limitée dans le temps .....	16
Le Ramadan.....	16
1.2.5. <i>La dénutrition</i> .....	16
1.3. LES DIFFÉRENTS ACTEURS MÉTABOLIQUES EN AMONT DU JEÛNE .....	16
1.3.1. <i>Rôle du contexte hormonal</i> .....	16
1.3.2. <i>Les substrats énergétiques</i> .....	16
1.3.3. <i>La mobilisation des substrats énergétiques au cours du jeûne</i> .....	16
1.3.4. <i>Les organes consommateurs</i> .....	17
Le cerveau .....	17
Le muscle .....	17
Le myocarde.....	17
1.3.5. <i>Les organes de maintien</i> .....	17
Le foie.....	17
Le tissu adipeux.....	17
1.3.6. <i>Les organes excréteurs</i> .....	17
Les reins .....	17
Les poumons .....	17
1.3.7. <i>Période postprandiale : apport et mise en réserve énergétique en prévision du jeûne</i> .....	18
1.3.8. <i>Le glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</i> .....	18
Rendement énergétique .....	18
Absorption .....	18
Transport.....	18
• Les transporteurs Na-glucose : SGLTs.....	19
• Les transporteurs de glucose à diffusion facilitée (GLUT).....	19
Métabolisme hépatique .....	19
Métabolisme extra-hépatique .....	19
Stockage .....	21
• Glycogène .....	21
• Triglycérides.....	22
1.3.9. <i>Les lipides</i> .....	22
1.3.10. <i>Les protéines</i> .....	22
1.4. LES PHASES ET LE DÉROULEMENT DU JEÛNE .....	23

1.4.1. Réserves mobilisables et utilisation.....	23
1.4.2. Les différentes phases d'utilisation énergétique au cours du jeûne.....	23
1.4.2.1. Phase glucidique : (fin digestion → 20h).....	23
• Origine du glucose.....	24
• Le cycle de Cori.....	24
• Le cycle glucose-alanine.....	24
• La lipolyse.....	25
1.4.2.2. Phase protéique : (de 24h → 3 jours).....	26
1.4.2.3. Phase cétonique : (de 4 jours → semaines).....	26
1.5. LA RÉGULATION HORMONALE DU JEÛNE.....	27
1.5.1. Le pancréas.....	27
1.5.2. La glande thyroïde.....	27
1.5.3. Les glandes surrénales.....	27
1.5.4. La glande pituitaire.....	27
1.5.5. Régulations métaboliques par le contexte hormonal du jeûne.....	27
1.5.6. Rôle du cycle circadien.....	28
1.6. BIBLIOGRAPHIE.....	29

## **CHAPITRE 2 : LE FOIE ..... 30**

2.1. RAPPEL ANATOMIQUE DU FOIE.....	30
2.1.1. La segmentation hépatique.....	30
2.1.2. La vascularisation hépatique.....	30
2.1.3. Le système biliaire.....	31
2.1.4. Le lobule hépatique.....	31
2.2. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU FOIE.....	32
2.2.1. La fonction métabolique.....	32
2.2.1.1. Métabolisme des hydrates de carbone.....	32
2.2.1.2. Métabolisme des lipides.....	32
2.2.1.3. Métabolisme des protéines.....	32
2.2.2. Le métabolisme des micronutriments.....	33
2.2.3. Le métabolisme de la bilirubine.....	33
2.2.4. Le métabolisme des drogues.....	33
2.2.5. Production, composition et rôles de la bile.....	33
2.2.6. La fonction de défense et de filtre.....	34
2.3. BIBLIOGRAPHIE.....	35

## **CHAPITRE 3 : LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL (FOIE ISOLÉ DE RAT) ..... 36**

3.1. INTRODUCTION.....	36
3.2. LE FOIE DE RAT.....	36
3.2.1. Différences entre le foie de rat et le foie humain.....	37
3.2.2. Choix du sexe des rats.....	37
3.2.3. Conditions de perfusion.....	37
3.3. LE MODÈLE MURIN DE FOIE PERFUSÉ EX-VIVO.....	38
3.3.1. Animaux.....	38
3.3.2. Anesthésie.....	38
3.3.3. Dissection et perfusion.....	38
3.3.4. La solution de perfusion.....	39
3.3.5. Le schéma du modèle expérimental.....	39
3.3.6. Prélèvements et biopsies.....	40
3.3.6.1. Mesures des paramètres de cytolyse hépatique et des métabolites.....	40
3.3.6.2. Mesures additionnelles.....	40
3.3.7. Phénomènes d'ischémie-reperfusion.....	40
3.4. BIBLIOGRAPHIE.....	41

<b>CHAPITRE 4 : L'AUTOPHAGIE .....</b>	<b>42</b>
4.1. DÉFINITION.....	42
4.2. ORIGINE.....	42
4.3. TYPES D'AUTOPHAGIE .....	42
4.4. L'AUTOPHAGIE .....	43
4.4.1. <i>Initiation et nucléation de la membrane</i> .....	44
4.4.2. <i>Elongation de la membrane</i> .....	45
4.4.3. <i>Fusion de l'autophagosome mature avec le lysosome</i> .....	46
4.4.4. <i>Rôle des protéines LC3 et p62</i> .....	47
4.4.4.1. <i>La protéine LC3</i> .....	47
4.4.4.2. <i>La protéine p62</i> .....	47
4.4.5. <i>La détection de l'autophagie</i> .....	48
4.4.6. <i>Hormones et voies de signalisation de l'autophagie</i> .....	49
4.4.6.1. <i>Hormones</i> .....	49
4.4.6.2. <i>Voies de signalisation</i> .....	49
4.4.6.2.1. <i>Voie insuline/PI3K/AKT</i> .....	49
4.4.6.2.2. <i>Voie de l'AMPK</i> .....	50
4.4.6.2.3. <i>Le complexe phosphatidylinositol 3 Kinase (PtdIns3K) de classe I et III</i> .....	50
4.4.6.2.4. <i>Voie Ras/PKA (AMP-dependent protein kinase A)</i> .....	51
4.4.6.2.5. <i>Voie du stress oxydant : MAPK/ERK/JNK</i> .....	51
4.4.6.2.6. <i>Autres voies de régulation de l'autophagie</i> .....	52
4.4.6.2.7. <i>Rôle des nucléotides : ADP</i> .....	52
4.4.6.2.8. <i>Rôle de l'HMGB1</i> .....	53
4.4.7. <i>Interaction entre apoptose et autophagie</i> .....	54
4.4.8. <i>Les modulateurs pharmacologiques de l'autophagie</i> .....	56
4.4.9. <i>Activité physiologique ou protectrice de l'autophagie</i> .....	59
4.4.10. <i>Autophagie et physiologie du foie (Figure 4.20)</i> .....	59
4.4.11. <i>Autophagie et pathologies du foie (Figure 4.20)</i> .....	60
4.4.11.1. <i>Autophagie et pathologies d'accumulation</i> .....	60
4.4.11.2. <i>Autophagie et stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)</i> .....	60
4.4.11.3. <i>Ischémie-reperfusion du foie</i> .....	61
4.4.11.4. <i>Consommation d'alcool</i> .....	62
4.4.11.4.1. <i>Consommation aiguë</i> .....	62
4.4.11.4.2. <i>Consommation chronique</i> .....	62
4.4.11.5. <i>Les hépatites et l'autophagie</i> .....	62
4.4.11.6. <i>Le développement de tumeurs hépatiques (Figure 4.22)</i> .....	62
4.5. BIBLIOGRAPHIE.....	64
<b>CHAPITRE 5 : OBJECTIF ET CADRE DES TRAVAUX DE THÈSE .....</b>	<b>68</b>
5.1. L'ARRIÈRE-PLAN HISTORIQUE.....	68
5.2. CONSIDÉRATIONS MÉDICALES RÉCENTES D'INTÉRÊT .....	68
5.3. POINT DE DÉPART ET ÉVOLUTION DES TRAVAUX DE DOCTORAT .....	69
5.4. BIBLIOGRAPHIE.....	70
<b>CHAPITRE 6 : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>71</b>
6.1. IMPORTANCE DE LA NATURE ÉNERGÉTIQUE DU MÉCANISME PROTECTEUR.....	71
6.2. RÔLE PROTECTEUR DES SUBSTRATS ÉNERGÉTIQUES : LACTATE ET ALANINE .....	83
6.3. IDENTIFICATION DU MÉCANISME PROTECTEUR : L'AUTOPHAGIE .....	99
6.4. IDENTIFICATION DE LA VOIE ACTIVATRICE DE L'AUTOPHAGIE.....	111
<b>CHAPITRE 7 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>125</b>
<b>CHAPITRE 8 : PERSPECTIVES.....</b>	<b>127</b>

8.1. PERSPECTIVES MÉCANISTIQUES .....	127
8.1.1. Utilisation d'autres techniques pour la détection de l'autophagie .....	127
8.1.2. Caractérisation du mécanisme de signalisation de l'autophagie induite par l'activation de P2Y13 par une approche pharmacologique complémentaire. ....	127
8.1.3.-Identification du mécanisme d'utilisation du lactate comme substrat énergétique par le foie.....	127
8.1.4. Rôle de Sirt1 dans l'induction de l'autophagie en condition de jeûne.....	127
8.1.5. Etude de la fonction du foie.....	127
8.2 AUTRES MODÈLES ANIMAUX .....	128
8.2.1. Les avantages du modèle ex-vivo .....	128
8.2.2. Les limites du modèle ex-vivo .....	128
8.2.3. Autres modèles murins.....	128
8.2.4. Modèles de cultures cellulaires .....	128
8.3 PERSPECTIVES CLINIQUES.....	129
8.3.1. Les transplantations d'organe.....	129
8.3.2. Les patients chirurgicaux.....	129
8.3.3. Les maladies génétiques.....	129
8.4. BIBLIOGRAPHIE.....	130

## **CHAPITRE 9 : LISTE D'ARTICLES PUBLIÉS ..... 131**

A Ugo et Arthur

« On m'a enseigné que la voie du progrès n'était ni rapide ni facile »  
**Marie Curie**

## AVANT-PROPOS

L'anesthésie est née avec la chirurgie, la préoccupation première étant que le chirurgien puisse exercer son art sur un champ opératoire dont la fixité et la stérilité ne soient pas remises en question par le patient lui-même, notamment par ses réactions et mouvements durant l'acte chirurgical. C'est pour cette raison que l'absence du ressenti des douleurs voire l'endormissement/réveil médicalement contrôlé ont toujours représenté les objectifs premiers à atteindre chez le patient par toute manœuvre anesthésique (locale, loco-régionale ou générale). Même l'hypnose actuellement en vogue dans son association à d'autres abords anesthésiques, puisque remplissant le même objectif, absence de réactions du patient gênant l'acte opératoire, pourrait être considérée comme une technique anesthésique à part entière.

L'anesthésiste dans sa pratique quotidienne doit veiller à ce que ces objectifs de l'anesthésie soient atteints tout à la fois en ne compromettant pas la survie et n'induisant pas de séquelles chez le patient sujet à l'intervention médicale. Ces objectifs autres que l'objectif chirurgical mentionné plus haut s'ajoutent ainsi aux objectifs généraux de l'anesthésie. Dans ce contexte, puisque des éléments comme un surdosage de la médication anesthésique et la suppression du réflexe empêchant la fausse déglutition peuvent mettre en péril le pronostic du patient, l'anesthésiste se doit de les éviter.

La suppression du réflexe empêchant la fausse déglutition explique pourquoi les patients soumis à une anesthésie générale doivent être à jeun (éviter la présence d'aliments pouvant être régurgités et dont la fausse déglutition causerait une obstruction des voies respiratoires). D'autre part, l'évitement du surdosage de la médication anesthésique doit parmi plusieurs déterminants tenir compte de l'activité hépatique impliquée dans le métabolisme des drogues anesthésiantes. Le foie présente cependant un intérêt non seulement *métabolisateur des médicaments* mais joue aussi un rôle clef dans l'homéostasie du métabolisme intermédiaire et énergétique global de l'organisme, homéostasie absolument requise pour une récupération post-opératoire adéquate du patient. Or, il se fait que le jeûne influence ce métabolisme hépatique et par ce biais ce rôle homéostatique du foie. Dans quelle mesure l'un (jeûne) peut compromettre ou à l'inverse promouvoir le rôle voire l'intégrité fonctionnelle de l'autre (foie) représente une question que l'anesthésiste se pose depuis bien longtemps. De par sa position, ce dernier sait aussi que le foie devenu non fonctionnel, comme le foie entièrement cirrhotique, doit faire l'objet d'une greffe hépatique. Là aussi la même question se pose : dans quelle mesure l'un (jeûne) peut compromettre ou à l'inverse promouvoir le rôle voire l'intégrité fonctionnelle de l'autre (greffon hépatique) au cours du processus complexe de la transplantation hépatique.

Bien évidemment, ces questions d'un intérêt manifeste pour l'anesthésiste méritent d'être creusées et pour ce faire nécessitent un modèle expérimental d'étude. Celui du foie (de rongeur) isolé est apparu relativement intéressant à sélectionner du fait qu'il permet d'étudier l'effet du jeûne sur le foie à la fois en tant qu'organe mais aussi en tant que greffon potentiel. Dans des travaux préliminaires du groupe, il avait été démontré que le jeûne de 18 heures (vs l'état nourri) du rat donneur était délétère pour le foie qui en était isolé. Cette thèse s'inscrit dans le sillage de ce résultat préliminaire avec comme objectifs la compréhension des bases moléculaires de ce résultat. Elle se propose de donner au lecteur un bref survol du jeûne, du foie et du modèle expérimental du foie isolé de rat avant de présenter les résultats publiés et en cours de publication qui ont été obtenus au cours de ce doctorat.

# CHAPITRE 1 : LE JEÛNE

## 1.1. La définition du jeûne

Le jeûne est un « nom masculin définissant une privation partielle ou totale (à l'exception, le plus souvent, d'eau), forcée ou non, de toute alimentation (solide et liquide) pendant un certain temps » [1]. Classiquement, l'on distingue durant la période séparant les repas trois états alimentaires : postprandial, post-absorptif et jeûnant. La période post prandiale réfère aux 8h suivant la prise alimentaire. La période post absorptive débute 12h après le repas. Le jeûne débute au-delà de 16h de privation alimentation. Se référant à la définition du Larousse, l'on voit cependant bien que le mot « jeûne » peut en pratique être utilisé pour « privation alimentaire » sans alors précision aucune de la durée de cette privation. En fonction de cette durée du jeûne, de son contexte et de la manière dont il survient, l'on peut distinguer différents types de jeûnes.

## 1.2. Les différents types de jeûne

### 1.2.1. Le jeûne pré-anesthésique

Le jeûne pré-anesthésique est l'absence de prise d'aliment et de boisson par « la bouche » (voie orale) après minuit. Cette notion a été introduite après la deuxième guerre mondiale suite au risque d'inhalation du contenu gastrique au moment de l'induction de l'anesthésie [2]. Bien qu'il existe peu de preuves scientifiques évidentes de son utilité, cette pratique a largement été utilisée durant le 20<sup>ème</sup> siècle. La notion de « rien par la bouche » à partir de minuit a été remise en question ces dernières décennies [3]. A l'heure actuelle, le jeûne pré-anesthésie se définit comme l'absence de prise d'aliment 6 heures avant toute chirurgie élektive et l'absence de prise de liquides clairs 2h avant la chirurgie [4].

### 1.2.2. Le jeûne total

Le jeûne est total si l'apport calorique est nul. Dans le cas d'un apport hydrique nul, on parle de jeûne sec.

### 1.2.3. Le jeûne continu

Celui-ci peut avoir une durée variable entre 1 et plus de 40 jours. Il était autrefois pratiqué par des jeûneurs professionnels qui pouvaient animer les foires pendant toute la durée de ces dernières en restant en permanence visibles au public qui pouvait confirmer l'absence de prise alimentaire. Aujourd'hui, le jeûne continu est plutôt pratiqué dans le cadre de la « grève de la faim » par des personnes voulant exprimer un message ou une opposition à leur environnement.

### 1.2.4. Le jeûne intermittent ou jeûne alterné

Le jeûne intermittent ou alterné est un type de diète qui consiste à jeûner volontairement une partie de la journée et de ne manger que durant un laps de temps réduit. Dans cette approche, la période de jeûne dure par exemple entre 16h et 20h par jour, et la période réservée aux repas donc de 4 à 8 heures par jour. Il existe d'autres variantes du jeûne intermittent comme le jeûne jour-alterné, la restriction énergétique intermittente, l'alimentation limitée dans le temps et le jeûne religieux dont le ramadan. Ces variantes sont brièvement commentées.

Le jeûne jour-alterné alterne des jours de jeûne dans lesquels aucune calorie n'est absorbée avec des jours de nutrition normale dans lesquels boissons et aliments sont consommés ad libitum [5]. Chez l'animal, des études démontrent que le jeûne jour-alterné réduit la prise de poids, améliore les concentrations sanguines de glucose et d'insuline, réduit le taux de cholestérol et de triglycérides, réduit l'expression des gènes pro-inflammatoires ainsi que le risque de cancer [6]. Chez l'homme, on observe une perte de poids significative et une amélioration des marqueurs de glucorégulation. Cependant, chez les patients obèses ou en surpoids, les taux de glucose, d'insuline et de triglycérides (TG) sont plus élevés en postprandial avec une augmentation des marqueurs de l'inflammation [7].

La restriction énergétique intermittente permet une consommation de 20-25% des besoins énergétiques durant certains jours de jeûne non consécutifs en alternance avec des jours de nutrition normale dans un rapport de 5 :2. Il

ne s'agit pas de jour de jeûne strict mais d'une limitation d'apport énergétique. Chez l'animal, on observe une réduction de la taille des adipocytes, de la prolifération cellulaire et du taux d'insuline-like growth factor 1 (ILGF 1). Chez l'humain, la réduction de poids observée est identique à celle observée dans le cadre d'une restriction calorique. De faibles modifications portant sur les marqueurs de la glucorégulation, les lipides et les marqueurs de l'inflammation ont été observées [8].

L'alimentation limitée dans le temps permet l'alimentation *ad libitum* dans des périodes de temps bien définies, ce qui induit des intervalles de jeûne réguliers (*vide supra*, l'exemple choisi pour fixer l'approche générale des jeûnes intermittents). Chez l'animal, l'alimentation limitée dans le temps entraîne une réduction du poids, du cholestérol total, des triglycérides, du glucose, de l'insuline, de l'IL6, du TNF $\alpha$  et améliore la sensibilité à l'insuline. Cette observation se rencontre quel que soit le moment du jeûne (diurne ou nocturne) et chez les 2 sexes [9].

Le Ramadan est caractérisé par l'absence de prise alimentaire entre le lever et le coucher du soleil, ce qui représente une période de jeûne d'environ 12h durant 1 mois. Cette pratique permet une réduction de poids transitoire et améliore les marqueurs biologiques inflammatoires : CRP, IL6 et TNF $\alpha$  ainsi que métaboliques : HBA1C chez les diabétiques de types 2 [10]. Globalement, les études observationnelles sur le jeûne chez l'humain supportent l'hypothèse que prolonger les périodes de jeûne réduit le risque de pathologies chroniques.

### **1.2.5. La dénutrition**

La dénutrition est un état distinct de celui du jeûne. Elle représente un « état pathologique secondaire à l'insuffisance d'apports nutritionnels en regard aux dépenses énergétiques de l'organisme » [11]. On parle de malnutrition lorsqu'en plus d'être insuffisants, les apports nutritionnels sont inadaptés.

## **1.3. Les différents acteurs métaboliques en amont du jeûne**

### **1.3.1. Rôle du contexte hormonal**

L'adaptation physiologique au jeûne est déclenchée par le contexte hormonal (haut rapport hormones hyperglycémiantes (glucagon, corticoïdes, catécholamines) /insuline) associé à cette période et développé plus loin dans le texte. Ce contexte hormonal gouverne les changements métaboliques permettant une mobilisation des réserves énergétiques précédemment constituées par l'organisme à partir des apports alimentaires. Il orchestre ainsi toute une série de modifications de l'expression des gènes et de la signalisation venant en support à cette mobilisation énergétique. Il y a lieu enfin de tenir à l'esprit que les mécanismes d'adaptation énergétique au jeûne abordés dans cette section peuvent relayer la libération de substrats énergétiques opérée par l'autophagie, un processus cellulaire de mobilisation énergétique qui fera l'objet d'une section séparée.

### **1.3.2. Les substrats énergétiques**

Pour rappel, les glucides, les lipides et les protéines représentent des substrats énergétiques. Qu'ils proviennent de l'alimentation ou d'une mobilisation à partir des réserves de l'organisme, ces substrats sont caractérisés par une valeur énergétique de 4 kilocalories/gramme pour les glucides et les protéines et de 9 kilocalories/gramme pour les lipides. Le rôle des substrats énergétiques est de permettre la production cellulaire d'ATP. Dans la période postprandiale, ce sera surtout le glucose qui fournira cette énergie *via* la glycolyse complétée par la pyruvate déshydrogénase et le cycle de Krebs dans les mitochondries. Durant cette période, l'excès de glucose, qui persiste après mise en réserve sous forme de glycogène, est alors stocké en lipides (acides gras, cholestérol) et participe au stockage de néolipides et lipides exogènes en alimentant la production du noyau glycérophosphate retrouvé dans les phospholipides et triglycérides. Le transport inter-tissulaire des lipides étant assisté par les lipoprotéines qui les incorporent (chylomicrons d'origine intestinale et VLDL hépatiques) et qui sont larguées dans la circulation générale.

### **1.3.3. La mobilisation des substrats énergétiques au cours du jeûne**

Au cours du jeûne, le glucose est produit essentiellement par la gluconéogenèse hépatique (cette dernière existant aussi au niveau de l'intestin, du rein et des astrocytes) d'abord à partir du glycogène hépatique et ensuite des substrats gluconéoformateurs alors que les acides gras sont restitués par les adipocytes (lipolyse). L'utilisation extrahépatique du glucose forme du pyruvate (glycolyse) rejoignant le foie sous forme de lactate ou d'alanine (cycle des frères Cori). Les acides gras libérés dans la circulation (lipolyse) peuvent être utilisés comme source énergétique alternative par les cellules et tissus de l'organisme, mais pas de manière exclusive par les cellules ayant un besoin absolu d'apport en glucose (neurones, globules blancs, médullaire rénale et enfin globules rouges). L'utilisation des réserves énergétiques

locales telles que le glycogène musculaire peut aussi être mise en œuvre de même que de manière ubiquitaire l'autophagie qui permet la mobilisation de substrats énergétiques à partir des constituants cellulaires. Classiquement, l'on considère que chronologiquement ce sont d'abord les réserves locales (ATP, glycogène), puis le glucose néoformé (à partir d'abord de glycogène local puis à partir du lactate et de l'alanine circulants issus de la glycolyse extrahépatique), puis les acides aminés libérés (dont l'alanine) par protéolyse musculaire modérée et les acides gras libérés par la lipolyse adipocytaire, et ensuite les corps cétoniques produits par les tissus cétogéniques (foie, rein, astrocytes) pour être utilisés par les tissus cétolytiques (la plupart des tissus de l'organisme). Cet ordre chronologique explique par exemple qu'une hypoglycémie chez un enfant en bas âge, bien sûr après exclusion des autres causes, puisse être attribuée si c'est le cas à une masse protéique (musculaire) trop faible de l'enfant.

#### **1.3.4. Les organes consommateurs**

Trois exemples d'organes consommateurs commentés ici sont le cerveau, le muscle strié squelettique et le myocarde.

##### **Le cerveau**

Il s'agit d'un organe non insulino-dépendant, notamment en ce qui concerne le contingent neuronal. Le cerveau consomme 25% de la production d'ATP et donc de l'énergie utilisée par un organisme. Le glucose et les corps cétoniques sont les seules sources d'énergie que le neurone peut avec le lactate utiliser pour son métabolisme. Les astrocytes sont assez proches métaboliquement des hépatocytes : ils peuvent oxyder les acides gras et former des corps cétoniques et *via* la glycolyse peuvent former du lactate à partir de leur réserve de glycogène. Il existe une navette centrée sur le lactate (astrocyte-neuron lactate shuttle) et une autre sur les corps cétoniques (astrocyte-neuron ketone body shuttle) permettant à l'astrocyte d'assister énergétiquement le neurone.

##### **Le muscle**

Le muscle possède un grand stock de protéines et de glycogène. Le glycogène est utilisé par le muscle lui-même ; Il représente entre 20 et 80% de la production d'ATP de l'organisme en fonction de l'activité physique. Il est métaboliquement « omnivore » en ce sens qu'il peut indifféremment utiliser les différents substrats énergétiques (acides aminés, acides gras et glucose) durant l'exercice et le jeûne. Il est dans ces conditions aussi le grand producteur de lactate utilisable par le foie dans le cadre du cycle des Cori. Comme mentionné plus haut, il peut aussi, au cours du jeûne, libérer par protéolyse des acides aminés gluconéoformateurs utilisables par la gluconéogenèse hépatique.

##### **Le myocarde**

Il s'agit d'un organe qui utilise essentiellement les acides gras comme source d'énergie que ce soit en période postprandiale ou lors du jeûne. Ce n'est que dans des conditions d'insuffisance cardiaque que le myocarde subit un shift métabolique l'amenant à utiliser du glucose en lieu et place des acides gras. Cela lui permet de produire une partie de son énergie (partie glycolytique de l'oxydation du glucose) en ne consommant pas d'oxygène.

#### **1.3.5. Les organes de maintien**

##### **Le foie**

Le foie possède une grande réserve de glucose sous forme de glycogène ainsi qu'une faible quantité de triglycérides. Il peut produire du glucose grâce à la glycogénolyse et par l'intermédiaire de précurseurs glucoformateurs tels que certains acides aminés, le glycérol, le lactate produits par les autres organes, le glycérol étant produit par la lipolyse et le lactate par la glycolyse.

Le foie stocke également le glucose en excès sous forme de glycogène dans un premier temps puis lorsque les réserves de glycogène sont maximales, sous forme de triglycérides.

La source principale d'énergie du foie est représentée par les acides aminés en période postprandiale et, en dehors de cette période, par les acides gras.

##### **Le tissu adipeux**

Le tissu adipeux constitue une réserve de triglycérides. En période d'insulinémie basse, il libère les acides gras et le glycérol. Sa source d'énergie réside dans le glucose en présence d'insuline et les acides gras en période d'insulinémie basse.

#### **1.3.6. Les organes excréteurs**

##### **Les reins**

Les reins permettent l'élimination des résidus non volatiles tels que l'azote (sous forme d'urée) et les acides (sous forme de sels d'ammonium). Les reins peuvent également faire de la néoglucogenèse durant le jeûne prolongé.

##### **Les poumons**

Les poumons permettent l'élimination du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et la prise d'oxygène.

### 1.3.7. Période postprandiale : apport et mise en réserve énergétique en prévision du jeûne

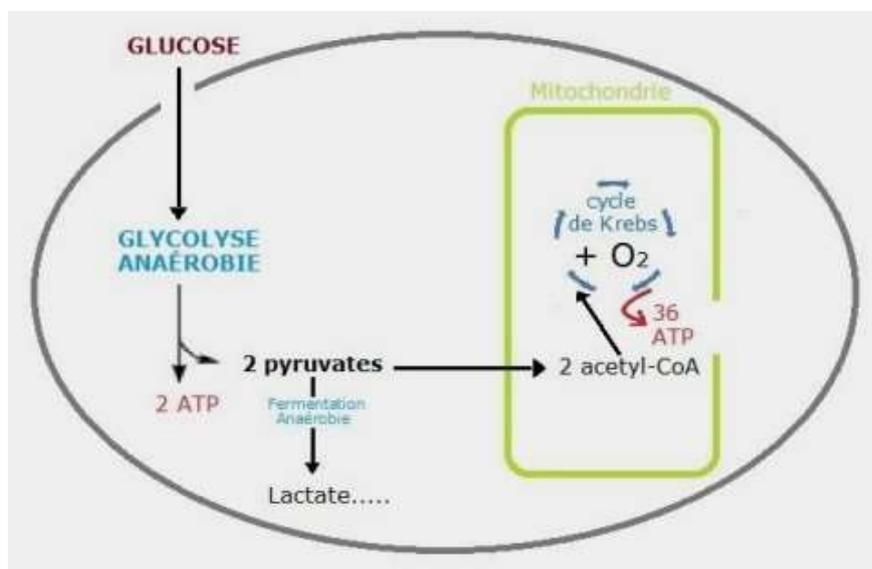
L'apport de substrats par l'alimentation étant discontinu dans le temps, l'organisme a développé un ensemble de mécanismes physiologiques permettant à la fois de stocker les nutriments en excès et de restituer, lors des périodes de jeûne, les substrats énergétiques stockés. Ces mécanismes de gestion énergétique de l'organisme opèrent de manière continue et incessante.

Au cours de la période postprandiale, l'organisme est inondé par une abondance de substrats énergétiques apportés par le repas et leur assimilation digestive. Les cellules de l'organisme disposent donc d'un excès relatif de substrats énergétiques et peuvent ainsi à la fois couvrir leurs besoins énergétiques tout en opérant une mise en réserve énergétique mobilisable à distance des repas. Cette dernière profite des effets de l'insuline. En effet, lors de l'ingestion d'un repas, la glycémie s'élève dans le sang. Cette augmentation de la glycémie entraîne une stimulation de la sécrétion d'insuline permettant au métabolisme de s'orienter vers le stockage de substrats énergétiques. Ce stockage est favorisé par les rôles joués par l'insuline et qui incluent l'inhibition de la lipolyse, la stimulation de la glycogénèse, la stimulation du transport de glucose vers les muscles et le tissu adipeux, la stimulation de la lipogénèse, l'inhibition de la néoglucogénèse, l'inhibition de la glycogénolyse.

### 1.3.8. Le glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)

#### Rendement énergétique

Le glucose de l'alimentation est utilisé par les cellules pour produire de l'ATP (**Figure 1.1**). La glycolyse, voie métabolique anaérobie peut se dérouler sans oxygène et produit deux molécules de pyruvate et **2 ATP (Figure 1.2)**. Les deux molécules de pyruvate issues du glucose pourront soit produire du lactate par la fermentation anaérobie, soit pénétrer dans la mitochondrie, être transformé en acétyl-coenzyme A et intégrer le cycle de Krebs pour fournir en présence d'oxygène : **36 ATP [12]**.



**Figure 1.1. – Schéma représentant la dégradation oxydative du glucose. Les voies métaboliques et leurs principaux produits sont indiqués [12].**

#### Absorption

L'absorption du glucose se fait *via* l'intestin. 30% du glucose absorbé est capté par le foie au premier passage par la veine porte, le reste du glucose est capté par les tissus extra-hépatiques : muscles et tissu adipeux. Dans ces tissus et les entérocytes, le glucose est oxydé ou stocké.

#### Transport

De par sa haute polarité et son faible degré de lipophilie, le glucose ne peut traverser passivement les membranes lipidiques. L'entrée de glucose au sein des cellules se fait grâce à une large famille de transporteurs. Il existe 2 grands types de transporteurs : les transporteurs Na-glucose (SGLTs) et les transporteurs de glucose à diffusion facilitée (GLUT) (**Tableau 1.1**) [13].

- Les transporteurs Na-glucose : SGLTs

Il s'agit de transporteurs possédant 14 hélices transmembranaires et dont les domaines carboxy et amino-terminaux se situent du côté extracellulaire des membranes. Il s'agit d'une famille de protéines de 60-80 kDa contenant 580-718 acides aminés.

- Les transporteurs de glucose à diffusion facilitée (GLUT)

Ces transporteurs possèdent 12 domaines transmembranaires et des extrémités carboxy et amino-terminales intracellulaires. Il existe de nombreux transporteurs GLUT: actuellement, on en dénombre 3 classes différentes et 15 sous-classes.

**Tableau 1.1. – Principaux transporteurs du glucose et distribution tissulaire [13].**

<b>Types de transporteurs</b>	<b>Distribution tissulaire</b>
GLUT 1 (Na indépendant)	Cellules $\beta$ du pancréas, globules rouges, hépatocytes, lymphocytes
GLUT 2	Cellules $\beta$ du pancréas, hépatocytes, épithélium intestinal, cellules tubulaires rénales
GLUT 3 (affinité +++)	Système nerveux central
GLUT 4 (externalisation)	Muscles squelettiques, cellules myocardiques, tissu adipeux, cerveau
SGLT (Na dépendant)	Cellules tubulaires rénales, épithélium intestinal

#### Métabolisme hépatique

Au niveau du foie, le transporteur GLUT 2 assure la captation de glucose par les hépatocytes. Le glucose intrahépatique est alors transformé en **glucose-6-phosphate** par la *glucokinase* (enzyme présente exclusivement dans le foie et le pancréas). L'activité de cette enzyme n'est pas inhibée par le G6P et dépend de la concentration en glucose (10-15 mM de glucose dans la veine porte après un repas). Trois issues métaboliques locales se présentent au G6P : son oxydation, son stockage sous forme de glycogène (glycogénèse) et de lipides (lipogénèse).

#### Métabolisme extra-hépatique

Le débit d'oxydation maximal de glucose par les tissus périphériques est de 4 mg/kg/min. Pour le muscle et les adipocytes, l'insuline permet l'activation des transporteurs GLUT4 par migration transmembranaire et diminue l'utilisation des acides gras en inhibant la lipolyse. Les 3 enzymes limitantes dans l'oxydation du glucose sont la *phosphofructokinase 1* (PFK1), la *pyruvate déshydrogénase* (PDH) et l'*hexokinase* (HK). L'oxydation du glucose dépend du taux d'ATP intracellulaire qui, s'il est élevé, peut inhiber la PFK1 et la PDH augmentant donc le G6P qui inhibe rétroactivement l'*hexokinase*.

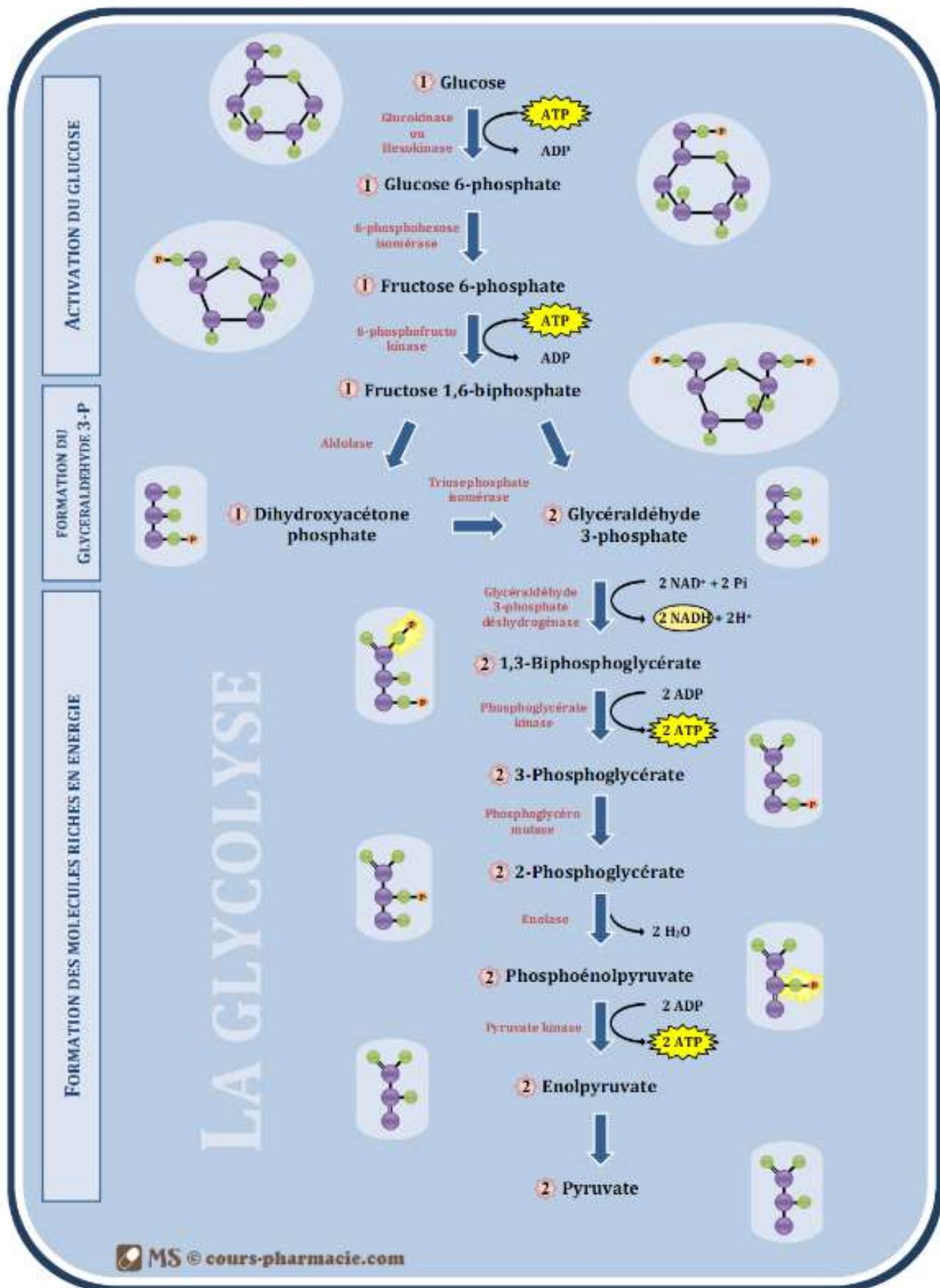


Figure 1.2. – Glycolyse : Représentation des étapes de l'oxydation du glucose en pyruvate [14].

## Stockage

- **Glycogène**

La forme de stockage première du glucose est le glycogène (**Figures 1.3 et 1.4**). Celui-ci est stocké dans le foie (70g) et le muscle (150-300g). Le glycogène est un moyen de stockage énergétique limité par le volume important occupé suite à son hydratation. Chaque gramme de glycogène est stocké avec 2g d'eau afin de maintenir l'isotonie intracellulaire. Sa densité calorique est mesurée sur glycogène « humide ». Deux enzymes interviennent dans le métabolisme du glycogène : la *glycogène synthase* et la *glycogène phosphatase*.

Au niveau du muscle, l'insuline stimule la *glycogène synthase*.

Au niveau du foie, l'insuline et le glucose régulent la synthèse de glycogène.

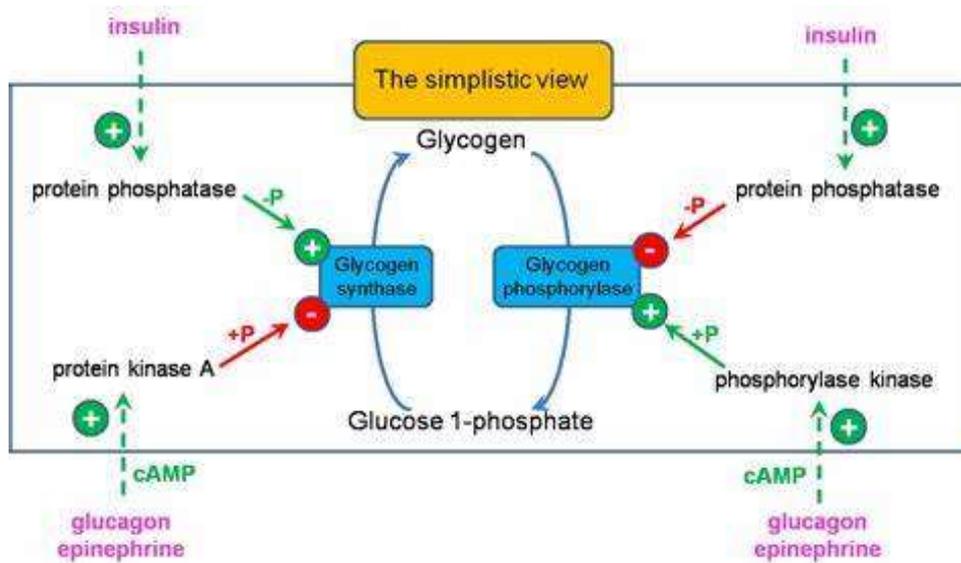


Figure 1.3. – Schéma représentant les mécanismes de régulation hormonale du métabolisme du glycogène. Les régulations positives et négatives sont indiquées respectivement en vert et rouge [15].

## La glycogénogénèse

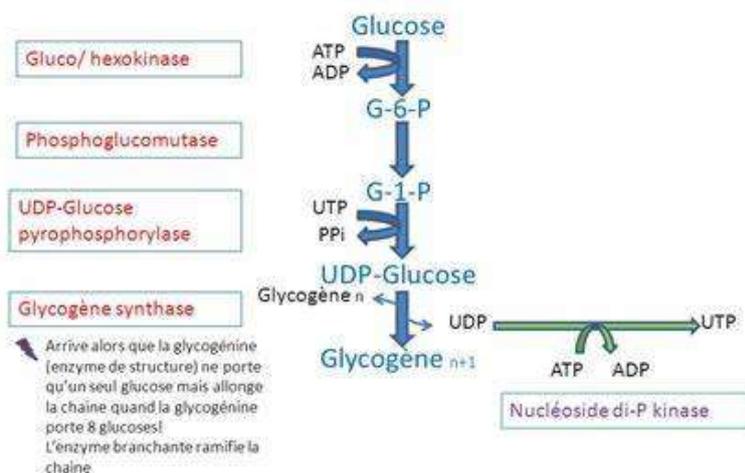


Figure 1.4. – Glucose et glycogénogénèse [15].

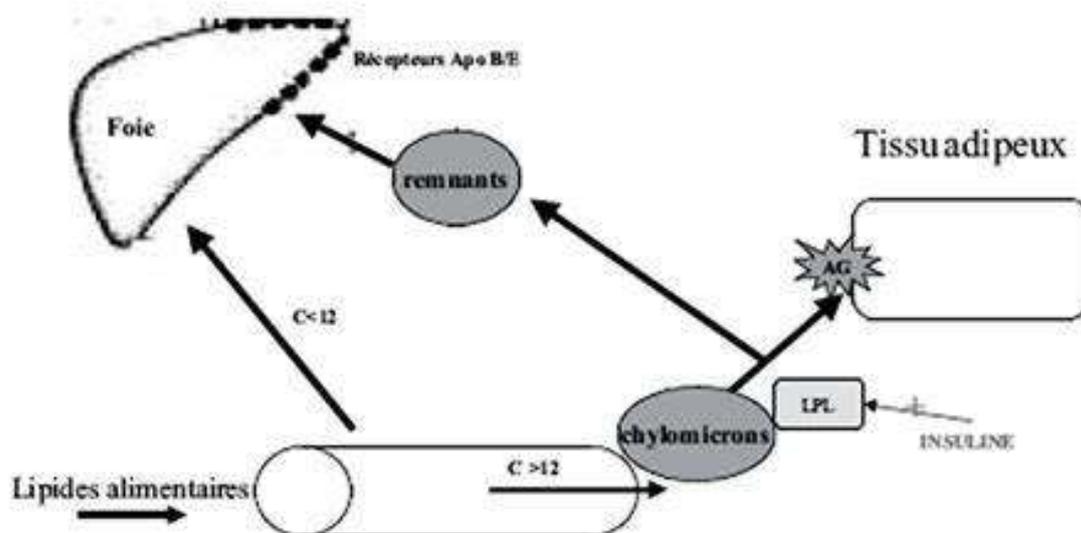
- Triglycérides

Une fois les réserves locales en glycogène remplies, l'excédent résiduel du glucose peut être stocké sous une forme beaucoup plus dense que le glycogène, puisque non hydratée, à savoir les triglycérides. Cette mise en réserve fait intervenir la glycolyse qui peut former d'une part le dihydroxyacétone phosphate et d'autre part le pyruvate. Dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl-CoA qui en se condensant avec l'oxaloacétate emprunte le cycle de Krebs pour former le citrate. Ce dernier sera exporté vers le cytosol où il pourra restituer l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA cytosolique peut acyler des protéines, être converti en cholestérol et en acides gras. Les acides gras synthésés (par l'acide gras synthase) à partir de l'acétyl-CoA issu de l'excédent de glucose pourront être successivement fixés par des acyltransférases sur le noyau glycérol-phosphate formé par réduction du dihydroxyacétone phosphate lui aussi issu de la glycolyse. Ces acylations du noyau glycérol phosphate mènent d'une part à la néosynthèse de phospholipides mais surtout en période post-prandiale de triglycérides. Comme précédemment mentionné, ces triglycérides peuvent être incorporés dans des lipoprotéines sécrétées (VLDL, chylomicrons) dans la circulation générale pour être hydrolysés, remétabolisés et stockés sous forme de triglycérides essentiellement au niveau du tissu adipeux (*vide infra*).

### 1.3.9. Les lipides

Au niveau des intestins, les triglycérides alimentaires sont hydrolysés dans la lumière intestinale et absorbés par les entérocytes. Dans les entérocytes, les acides gras à chaîne courte et moyenne passent directement par la veine porte vers le foie. Les acides gras à longue chaîne sont ré-estérifiés et, sous forme de triglycérides, incorporés dans les chylomicrons qui passent par le canal thoracique avant de rejoindre la circulation générale. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline stimule la *lipoprotéine lipase* (LPL) et permet la captation des acides gras restockés sous forme des triglycérides par l'adipocyte.

Au niveau du foie, les « remnants » (lipoprotéines après hydrolyse des triglycérides et enrichies en apo E) sont captés *via* des récepteurs aux Apo E et B. Il y a donc en période postprandiale, une orientation importante des lipides ingérés vers le stockage dans le tissu adipeux tout comme pour l'excédent de glucose converti par le foie en triglycérides dans les VLDL (*vide supra*) (**Figure 1.5**).



**Figure 1.5.** –Schéma représentant l'hydrolyse des lipides alimentaires au départ du tube digestif. C < 12 : acides gras à chaîne inférieure à 12 carbones. C > 12 : acides gras à chaîne supérieure à 12 carbones [16].

### 1.3.10. Les protéines

Les protéines alimentaires sont digérées et hydrolysées en acides aminés dans le tube digestif. Au niveau du foie, les acides aminés peuvent subir une oxydation par désamination ou une utilisation directe pour la synthèse de protéines hépatiques. Les tissus périphériques peuvent capter les acides aminés transitant par le sang.

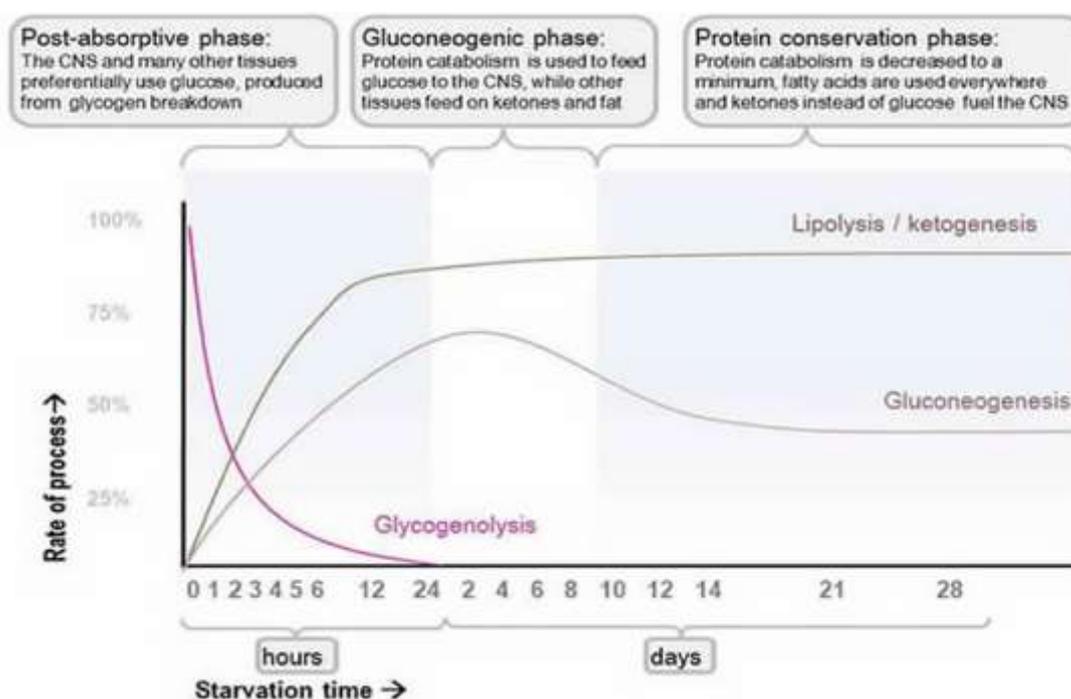
## 1.4. Les phases et le déroulement du jeûne

### 1.4.1. Réserves mobilisables et utilisation

Lorsque l'insulinémie baisse et que le glucagon est sécrété, le métabolisme bascule vers l'utilisation des réserves énergétiques. Le **tableau 1.2** donne une vue d'ensemble de la répartition des réserves énergétiques chez un individu de 70 kg et la **figure 1.6** des différentes phases du déroulement du jeûne.

**Tableau 1.2. – Distribution des réserves énergétiques pour un organisme de 70 kg.**

Substrats énergétiques	Tissus	Energie (Kcal)	Poids (g)
Triglycérides	Tissu adipeux	108 000	12 000
Glycogène	Foie	200 (1/3)	70
	Muscles	400 (2/3)	120
Glucose	Liquides circulants	80	20
Protéines	Muscles	24 000	6 000



**Figure 1.6. – Evolution de l'activité des voies métaboliques impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique au cours du jeûne [17].**

### 1.4.2. Les différentes phases d'utilisation énergétique au cours du jeûne

#### 1.4.2.1. Phase glucidique : (fin digestion → 20h)

Durant la phase d'urgence du jeûne dit « **jeûne court** », la glycémie baisse. Lorsqu'elle atteint un seuil critique, le glucagon est sécrété et induit la mobilisation des réserves glucidiques stockées dans le foie.

Lorsque les stocks de glucose hépatique sont épuisés, l'organisme met en œuvre un ensemble de mécanismes adaptatifs permettant de produire du glucose à partir de précurseurs non glucidiques : c'est la néoglucogenèse. Le but étant de maintenir la glycémie constante.

A l'état basal, l'utilisation de glucose est de 2-2,5 mg/kg/min (70kg). Cette utilisation du glucose se fait pour 80% par les tissus non insulino-dépendants : cerveau; médullaire rénale; intestin; peau; éléments figurés du sang et pour 20% par les muscles squelettiques.

- Origine du glucose

La stimulation de la glycogénolyse hépatique ( $\uparrow$  glucagon et  $\downarrow$  insuline) est couplée à l'inhibition de la glycolyse. La réserve de glycogène est épuisée après 20h. 75% des besoins en glucose durant la phase de jeûne court proviennent de la glycogénolyse des 70 grammes de glycogène hépatique.

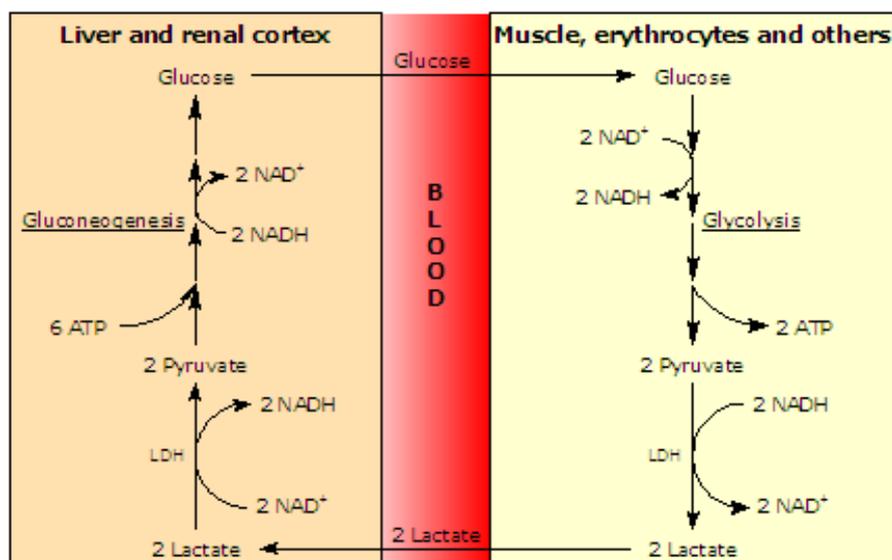
Une stimulation de la néoglucogenèse (25-30%) est aussi assurée par :

- Le glycérol (lipolyse) provenant du tissu adipeux (1-2%)
- Les acides aminés glucoformateurs (alanine, glutamine) provenant des muscles (10-15%)
- Le lactate et pyruvate (10-15%)

Une augmentation de la synthèse des enzymes de la néoglucogenèse est observée en parallèle avec une diminution concertée de la synthèse des enzymes de la glycolyse.

- Le cycle de Cori

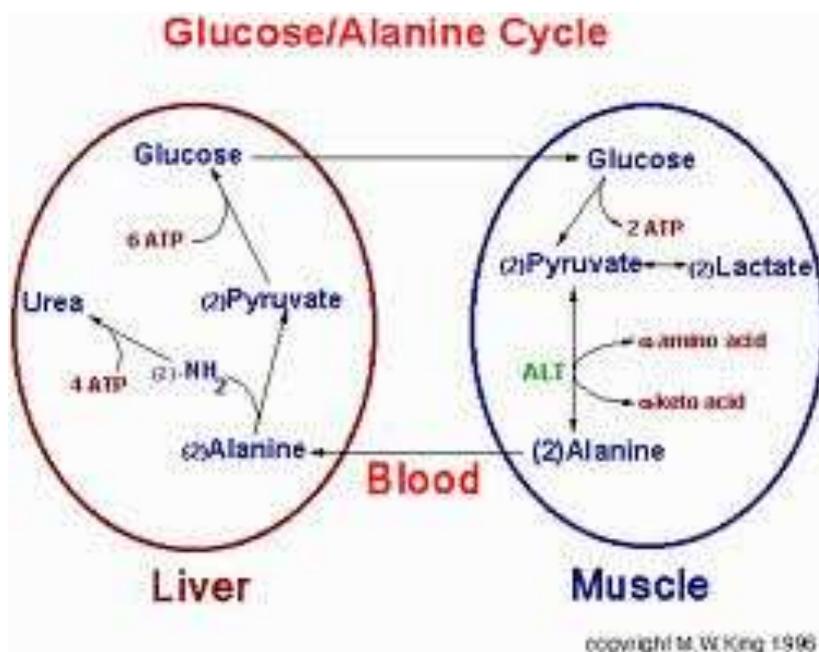
Le cycle décrit par les frères Cori (cycle de Cori) joue un rôle important car il permet la production de glucose par la néoglucogenèse hépatique à partir du lactate produit par la glycolyse extra-hépatique, notamment musculaire. Il est à noter que le muscle est incapable de libérer directement du glucose dans la circulation sanguine suite à l'absence de *glucose-6-phosphatase* (**Figure 1.7**).



**Figure 1.7.** –Le cycle de Cori (cycle ou navette systémique du lactate). Schéma représentant les principales voies métaboliques composant ce cycle. Les organes dans lesquels ces voies sont principalement actives sont indiqués [17].

- Le cycle glucose-alanine

Il s'agit d'une variante du cycle de Cori où le produit du pyruvate formé en périphérie n'est plus le lactate mais l'alanine (**Figure 1.8**). Non seulement la charge énergétique du pyruvate est transférée vers le foie pour la gluconéogenèse mais aussi la charge ammoniacale fixée sur le pyruvate sous forme d'alanine. D'autre part, l'alanine, comme les autres acides aminés, peut aussi être formée par protéolyse. De manière plus large, la gluconéogenèse aux dépens des acides aminés fournit 10-15% des substrats dans la phase précoce de jeûne. Tous les acides aminés, excepté la leucine, sont potentiellement glucoformateurs. Cependant, certains sont plus spécifiquement utilisés. L'alanine, qui représente 7-10% de tous les acides aminés dans le muscle, compte pour 30-40% des acides aminés libérés par le muscle après une nuit de jeûne. Comme mentionné plus haut, cela reflète la synthèse de novo d'alanine par le muscle au départ de l'apport de glucose libéré par le foie. Au sein du muscle, le glucose capté est transformé en pyruvate et transaminé en alanine puis libéré par le muscle dans la circulation sanguine. Le foie capte l'alanine pour reformer du glucose. L'urée produite à cette occasion par le foie est éliminée par les reins. L'insuline inhibe la captation hépatique d'alanine.



copyright M. W. King 1996

Figure 1.8. – Le cycle glucose-alanine. Schéma représentant les principaux intermédiaires et produits de ce cycle. Les organes principalement impliqués dans le cycle sont indiqués [18].

- La lipolyse

La lipolyse du tissu adipeux est dépendante du taux d'AMPc intracellulaire régulée par les catécholamines et par l'insuline (**Figure 1.9**). Elle produit du glycérol et des acides gras par hydrolyse des triglycérides. Trois lipases interviennent dans cette lipolyse des triglycérides mais seule la *triglycéride lipase* est hormono-sensible. Les acides gras provenant de la lipolyse sont utilisés par tous les tissus sauf par le cerveau et les éléments figurés du sang à des fins énergétiques. Les acides gras (classiquement à nombre pair de carbone) ne peuvent pas être convertis en glucose. Ils ne sont donc pas gluconéogéniques mais sont essentiels au déroulement de la gluconéogenèse puisque leur oxydation mitochondriale fournit les équivalents réducteurs (NADH) nécessaires à la gluconéogenèse à partir de précurseurs gluconéogéniques tels que le lactate ou l'alanine. A l'inverse, le glycérol est gluconéogénique. Il est converti en glycérol-3-phosphate par la glycérokinase hépatique pour former du dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la glycolyse mais aussi de la gluconéogenèse.

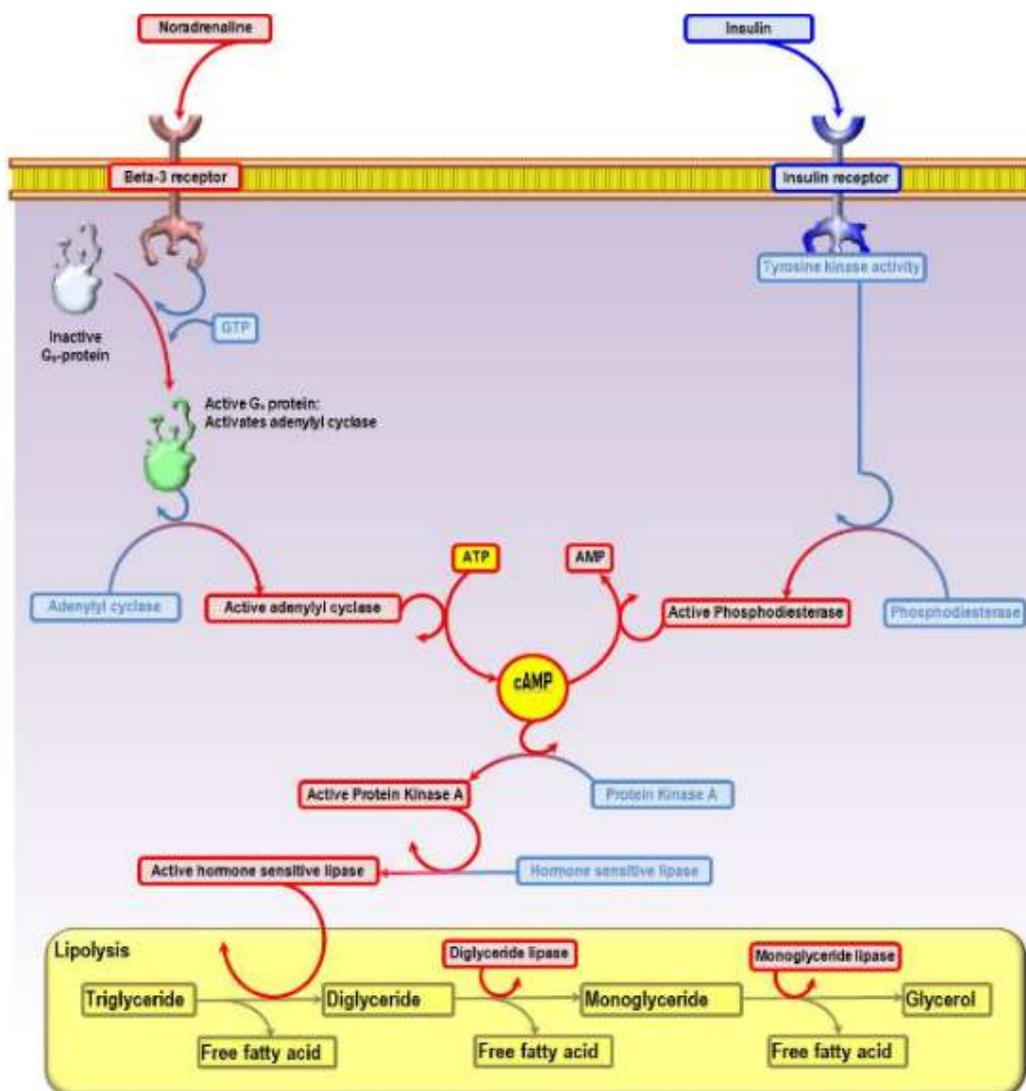


Figure 1.9. – Schéma représentant la régulation hormonale contrôlant la lipolyse dans le tissu adipeux. L'insuline inhibe la lipolyse (bleu), les catécholamines stimulent la lipolyse (rouge) [17].

#### 1.4.2.2. Phase protéique : (de 24h → 3 jours)

La néoglucogenèse à partir des acides aminés issus de la protéolyse couvre en grande partie les besoins en glucose du cerveau : 120g/jour, le reste repose sur la production de glycérol par lipolyse. La production de corps cétoniques est induite. L'augmentation de la protéolyse survenant au cours de cette phase est associée à un bilan azoté négatif.

#### 1.4.2.3. Phase cétonique : (de 4 jours → semaines)

C'est la phase dite de « *jeûne prolongé* ».

La lipolyse s'intensifie et fournit en abondance les acides gras qui seront :

- Soit oxydés au niveau du foie, du muscle strié squelettique, du myocarde, du tube digestif et du rein.
- Soit transformés en corps cétoniques (cétogenèse) essentiellement par le foie mais aussi le rein et les astrocytes.

La cétogenèse induit la synthèse de  $\beta$ -hydroxybutyrate et d'acétoacétate. L'acétone formé par décarboxylation spontanée de l'acétoacétate est volatile et est éliminé par les poumons.

La cétolyse permet l'utilisation énergétique des corps cétoniques dont la valeur énergétique du moins pour le  $\beta$ -hydroxybutyrate est identique à celle du glucose. Elle survient dans la quasi-totalité des cellules extra-hépatocytaires. Au niveau du cerveau et du muscle, l'utilisation des corps cétoniques est très rapide car ils shuntent la glycolyse

cytoplasmique, pénètrent dans la mitochondrie pour former de l'acétyl-coA et rentrer dans le cycle de Krebs. Une molécule d'acétoacétate (C4) génère 2 molécules d'acétyl-CoA comme le glucose (C6).

L'hypercétonémie du jeûne exerce un effet direct d'épargne protéique en réduisant la libération d'alanine par le muscle par inhibition de la synthèse d'alanine au départ de l'oxydation des acides aminés à chaînes ramifiées et donc en empêchant le cycle alanine-glucose [18].

Dans cette phase cétonique du jeûne, la néoglucogenèse est réduite et le bilan azoté s'équilibre. L'épargne protéique peut persister jusqu'à la mobilisation de 80% du tissu adipeux ce qui représente environ 40 jours de jeûne (adulte normal). Au-delà de 40 jours, la néoglucogenèse va reprendre le dessus à partir des produits du catabolisme protéique et entraîner des dégâts physiologiques irréversibles, des dysfonctionnements organiques pouvant aller jusqu'à la mort. Les protéines, ayant des fonctions essentielles, la perte de 1/3 voire 1/2 de leur stock est incompatible avec la survie [18].

## **1.5. La régulation hormonale du jeûne**

L'adaptation physiologique au jeûne fait intervenir un contrôle hormonal et neuroendocrinien.

### **1.5.1. Le pancréas**

Le pancréas est responsable de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et de la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  de ces îlots de Langerhans. Hormis l'insuline et le glucagon, le pancréas peut également libérer de la somatostatine des cellules  $\delta$  ce qui permet la baisse de la glycémie.

L'augmentation de la glucagonémie en début de jeûne n'est que transitoire, elle donne un signal au foie de se comporter comme un organe glyco-génolytique, céto-génique et néo-glucogénique.

L'insulinémie chute rapidement au début du jeûne, ce qui active la lipolyse, la néoglucogenèse et la protéolyse musculaire tandis que lors du jeûne prolongé, le maintien d'un faible taux d'insuline évite l'emballement de la lipolyse et de la céto-génèse.

### **1.5.2. La glande thyroïde**

Lors du jeûne, on observe une baisse des dépenses énergétiques, une diminution de conversion de thyroxine en triiodothyronine. La thyroxine augmente la glyco-génolyse et l'absorption intestinale de glucose.

### **1.5.3. Les glandes surrénales**

Les hormones surrénales jouent également un rôle dans la régulation du métabolisme glucidique. Les glandes surrénales libèrent, par le cortex surrénalien des glucocorticoïdes (cortisol) et par la médullaire surrénalienne, de l'épinéphrine qui ont pour effet d'augmenter la glycémie. Le cortisol stimule la gluconéogenèse et l'épinéphrine stimule la glyco-génolyse et la libération d'acides gras par les tissus adipeux.

### **1.5.4. La glande pituitaire**

La glande pituitaire régule la glycémie via la sécrétion d'ACTH et d'hormone de croissance. L'ACTH stimule la sécrétion de cortisol par les glandes surrénales et secondairement la libération d'acides gras par le tissu adipeux. L'hormone de croissance stimule la néoglucogenèse et les hormones thyroïdiennes, inhibe la captation hépatique de glucose et la sécrétion d'insuline.

### **1.5.5. Régulations métaboliques par le contexte hormonal du jeûne**

Au cours du jeûne, la régulation hormonale va entraîner une modification de l'activité des différentes enzymes en modifiant l'expression de leurs gènes. L'augmentation du glucagon et la baisse concomitante de l'insuline dans le sang entraîne dans le foie une activation de gènes codant pour des enzymes de la néoglucogenèse tel que la *phosphoénolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) par augmentation de sa transcription, activant ainsi la néoglucogenèse. Le jeûne inactive la synthèse de l'*acétylcoenzyme A carboxylase* qui active secondairement la céto-génèse par accumulation d'acétylCoA. Le jeûne entraîne une diminution du nombre de transporteurs GLUT 4 périphériques entraînant une diminution de l'utilisation périphérique de glucose [15]. La lipase hormo-dépendante du tissu adipeux se voit activée au cours du jeûne.

### 1.5.6. Rôle du cycle circadien

Le cycle circadien 24h jour-nuit est sous contrôle neuroendocrinien. (**Figure 1.10**) Il joue également un rôle important au niveau du métabolisme. En synchronisant les cellules avec leur environnement, le cycle circadien module une grande partie des processus métaboliques. Le cycle circadien est un mécanisme moléculaire autonome permettant à la cellule, à l'organe ou l'organisme tout entier d'anticiper et de préparer à un stimulus ou stress extracellulaire bien avant son apparition.

Des études sur les rats ont démontré que le rythme du métabolisme du glucose n'est pas médié purement par des changements de comportement (exercice physique...) mais également par un mécanisme circadien endogène [19]. L'ablation de l'horloge centrale endogène rompt l'homéostasie glucidique.

Le rythme circadien de l'hépatocyte joue un rôle important dans les processus impliqués dans l'homéostasie glucidique tels que la gluconéogenèse [20].

Scheer FA and al ont démontré qu'en modifiant le cycle circadien de 24h à 28h, ils observaient chez l'humain, une augmentation de la résistance à l'insuline [21].

Mukherji A and al ont démontré que les souris, obligées de manger durant la journée, période de repos classique, étaient plus sensibles à développer des pathologies telles que le diabète [22].

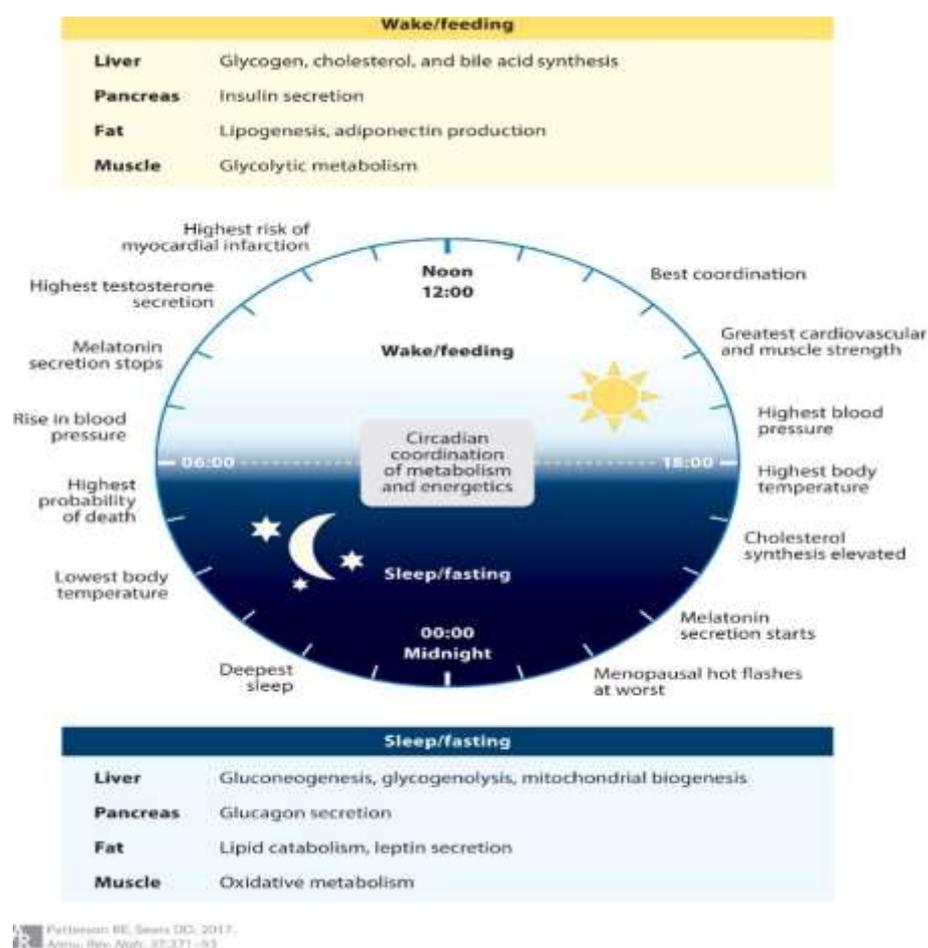


Figure 1.10. – Schéma représentant la régulation circadienne des comportements, des hormones, de la physiologie, du métabolisme et de l'énergie. [5]

## 1.6. Bibliographie

- (1) Définition du dictionnaire de français Larousse.
- (2) Mendelson CL. The aspiration of stomach contents into lungs during obstetric anesthesia. *Amer J Obstet Gynecol* 1946; 52:191-205.
- (3) The shortened fluid fast and the Canadian Anaesthetists' Society's new guidelines for fasting in elective/emergency patients. *Can J Anaesth* 1990; 37: 905-906.
- (4) Eriksson LI, Sandin R. Fasting guidelines in different countries. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40: 971-974.
- (5) Patterson RE, Sears DD. Metabolic Effects of Intermittent Fasting. *Annu Rev Nutr* 2017 Aug 21; 37:371-393.
- (6) Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007 Jul; 86:7-13.
- (7) Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, Anton SD, Ravussin E. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolism. *Am J. Nutr.* 2005; 81:69-73.
- (8) Varady KA. Intermittent versus daily caloric restriction: Which diet regimen is more effective for weight loss? *Obes.Rev.* 2011; 12: e 593-601.
- (9) Chung H, Chou W, Sears DD, Patterson RE, Webster NJG, Ellies LG. Time-restricted feeding improves insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of postmenopausal obesity. *Metabolism* 2016; 65:1743-54.
- (10) Faris MA, Kacimi S, Al-kurd RA, Fararjeh Ma, Bustanji YK, et Al. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr. Res.* 2012; 32:947-55.
- (11) Définition du dictionnaire français Larousse.
- (12) Hantzidiamantis PJ, Lappin SL. *Physiology, Glucose*. Statpearls Publishing 2020-2019 Aug 13.
- (13) Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev*, 2016; 8:5-9.
- (14) <https://www.cours-pharmacie.com/biochimie/metabolisme-des-glucides.html>
- (15) Support de cours : Utilisation des substrats, 2010-2011, enseignants de nutrition. [http://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement/nutrition\\_7/site/html](http://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement/nutrition_7/site/html)
- (16) <https://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement>
- (17) <https://derangedphysiology.com/main/required-reading/endocrinology-metabolism-and-nutrition/chapter%20318/physiological-adaptation-prolonged-starvation>
- (18) Kerndt PR, Naughton JL, Driscoll CE, Loxterkamp DA. Fasting: The history, pathophysiology and complications. *West J Med* 1982 Nov; 137:379-399.
- (19) Bailey S, Udo U, Young M, Circadian regulation of metabolism. *J Endocrino.* 2014 August; 222(2): R75-R96.
- (20) La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 2001; 50:1237-1243.
- (21) Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros. CS, Shea. SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *PNAS* March 17, 2009; 106(11):4453-58.
- (22) Mukherij A, Bailey S, Staels B, Baumert T. The circadian clock and liver function in health and disease. *J Hepatol.* 2019; 71(1), 200-211.

## CHAPITRE 2 : LE FOIE

### 2.1. Rappel anatomique du foie

Le foie est un organe essentiel du corps. Volumineuse glande annexe du tube digestif, il assure de nombreuses fonctions biochimiques indispensables à la vie de l'organisme.

Le foie est situé dans l'abdomen et occupe l'hypochondre droit. Il reçoit l'ensemble du sang veineux provenant du tube digestif et représente environ 2 % du poids du corps. Le foie adulte pèse environ 2300 grammes.

Il a une forme demi-ovoïde orienté transversalement, sa partie droite étant la plus importante. Il est de couleur rouge brun, sa consistance est ferme et il est entouré d'une capsule fibreuse : la capsule de Glisson.

#### 2.1.1. La segmentation hépatique

Le foie se divise en 8 segments fonctionnels (**Figure 2.1**). Le segment I est le lobe caudé. Les segments II et III correspondent au lobe gauche. Le segment IV forme le lobe carré, et les segments de V à VIII, le lobe droit. Les lobes droit et gauche sont séparés au niveau diaphragmatique par le ligament suspenseur du foie. Le foie droit est constitué des segments du lobe droit tandis que le foie gauche est constitué des segments du lobe gauche, des lobes carré et caudé.

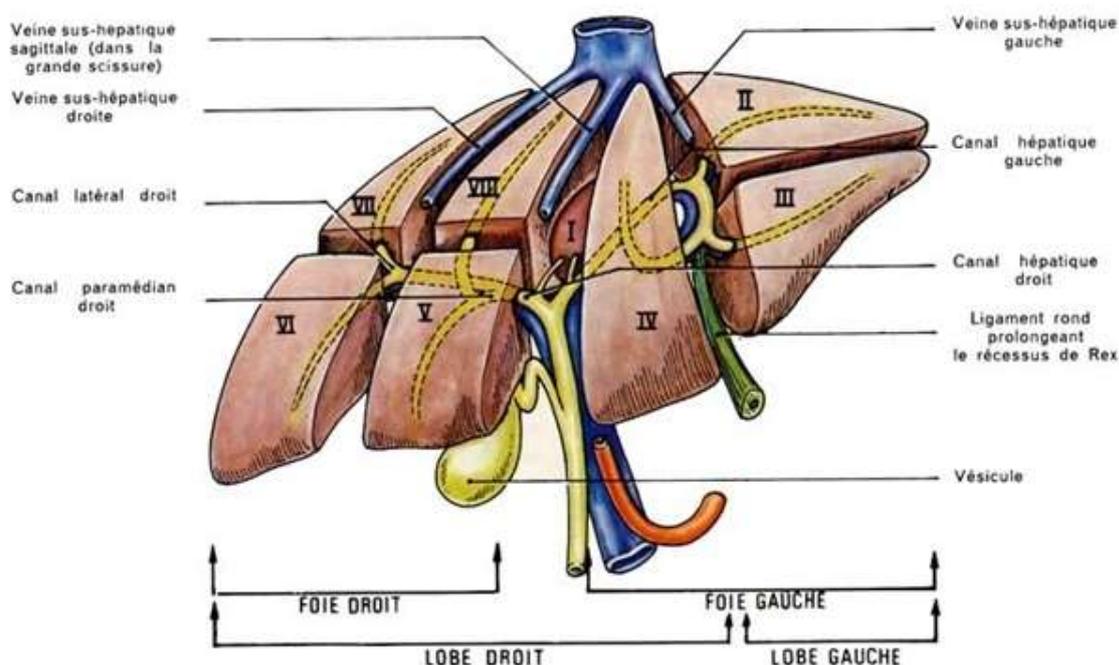


Figure 2.1. – Schéma représentant la segmentation hépatique. Les segments sont définis par un chiffre romain [1].

#### 2.1.2. La vascularisation hépatique

La vascularisation hépatique représente 25% du débit cardiaque. Le flux sanguin hépatique se fait pour 70-80% par la veine porte et pour 20-30% par l'artère hépatique.

La vascularisation hépatique est assurée par :

1. Un pédicule afférent : *le pédicule hépatique* comprenant la veine porte et l'artère hépatique.
2. Un pédicule efférent : les veines sus-hépatiques.
3. *L'artère hépatique* propre provient de l'artère hépatique commune issue de la trifurcation du tronc cœliaque. Les artères hépatiques droite et gauche vont donner les artères segmentaires du foie. *La veine porte* draine le sang du tube digestif, du pancréas et de la rate et provient de la réunion de la veine mésentérique supérieure avec le tronc formé par la veine splénique et la veine mésentérique inférieure.

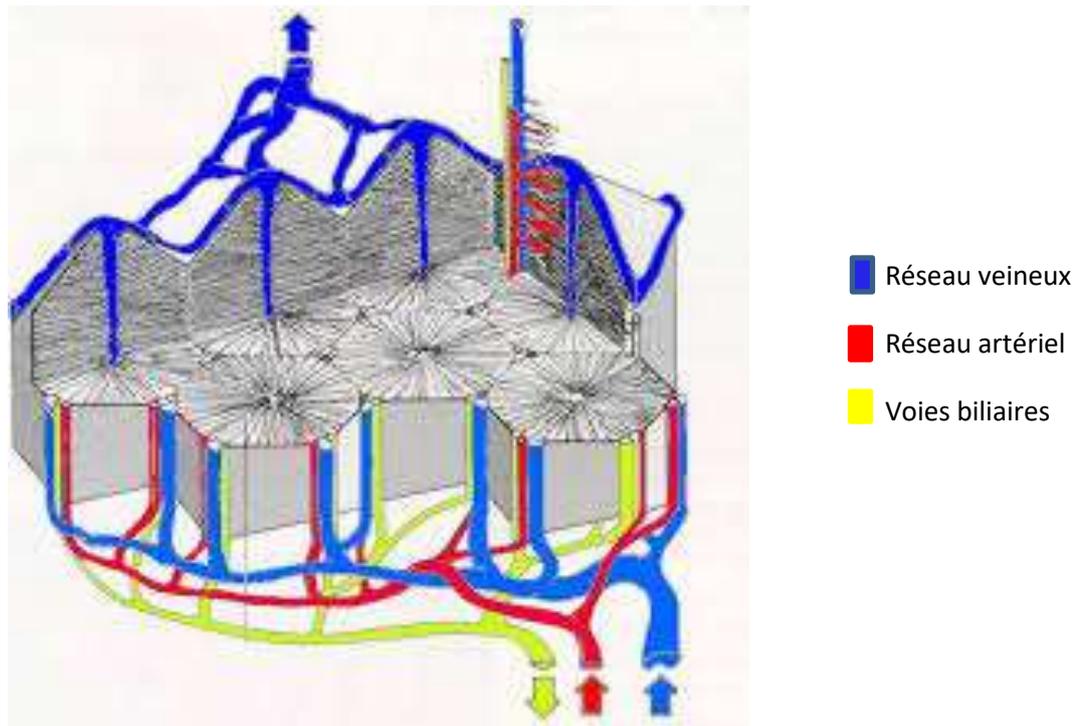
La veine sous hépatique se divise, au niveau du hile, en 2 branches : droite et gauche qui donnent, à leur tour, des branches segmentaires. La veine porte a également des anastomoses avec les veines œsophagiennes, il existe donc une anastomose porto-cave (shunt) possible lors d'obstacle sur la veine porte (varices œsophagiennes).

Le sang artériel provenant de l'artère hépatique et le sang de la veine porte passent dans les sinusoides hépatiques pour être drainés dans les veines centrolobulaires (**Figure 2.2**).

*Les veines sus-hépatiques* naissent dans le parenchyme hépatique, elles se jettent dans la veine cave inférieure.

*Les lymphatiques hépatiques* sous capsulaires superficiels et intra parenchymateux se drainent à la fois vers les nœuds lymphatiques latéro-aortiques et vers le pédicule thoracique interne.

L'innervation du foie se fait par le plexus coeliaque, les nerfs vagues et par la branche sensitive abdominale du nerf phrénique droit.



**Figure 2.2. – Schéma représentant la vascularisation hépatique : veine porte en bleu, artère hépatique en rouge et le système biliaire en jaune [2].**

### **2.1.3. Le système biliaire**

La bile diffuse en sens opposé au flux sanguin, passant des canalicules biliaires entre les hépatocytes vers les canaux biliaires inter lobulaires, le canal hépatique commun puis le cholédoque après abouchement du canal cystique (**Figure 2.2**).

### **2.1.4. Le lobule hépatique**

Le lobule hépatique est l'unité structurale et fonctionnelle du foie. Il a une forme hexaédrique centrée sur la veine centrolobulaire. Il possède, à chaque coin, une « triade portale » composée d'une branche de la veine porte, de l'artère hépatique et d'un canal biliaire appelée *l'espace porte*.

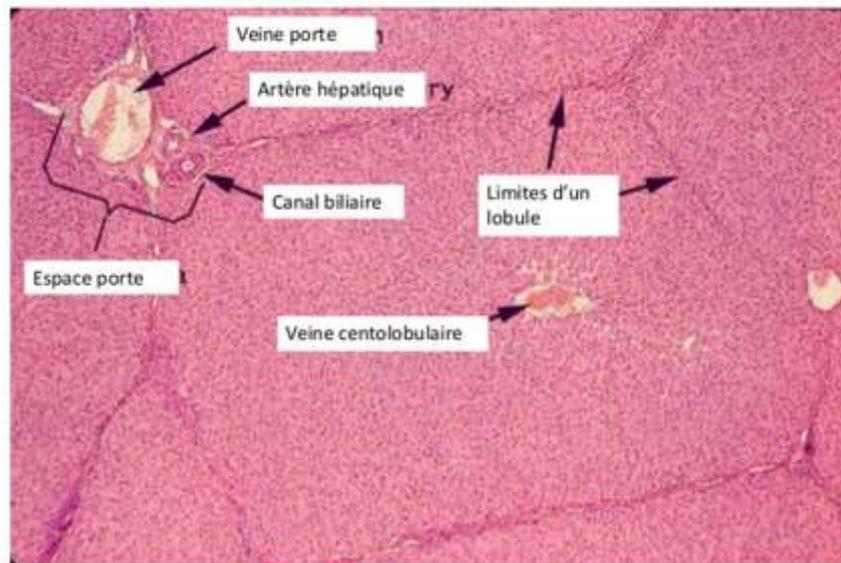
Hormis les hépatocytes qui représentent 60% des cellules du parenchyme hépatique, il existe toute une série d'autres types cellulaires ayant chacun un rôle à jouer au sein des lobules hépatiques, notamment les macrophages résidents du foie nommés les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes et les fibroblastes. L'espace de Disse, espace entre la membrane basale des hépatocytes et la lumière des sinusoides permet aux hépatocytes d'être largement en contact avec le sang. Les hépatocytes ont des prolongements cytoplasmiques qui leur permettent non seulement d'être en contact avec l'espace de Disse mais également avec la lumière des sinusoides grâce aux pores fenestrés des cellules endothéliales [3]. Cet espace contient une matrice extracellulaire composée de collagène, protéoglycanes et autres protéines. L'espace de Disse contient également des cellules de Kupffer et des cellules de Ito.

De par leurs localisations, les hépatocytes sont divisés en 3 zones.

La **zone 1** correspond aux hépatocytes situés dans la région périportale : la proximité des hépatocytes avec l'espace porte fait qu'ils sont les mieux oxygénés et ont une capacité rapide de régénération. Cette zone joue donc un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif ( $\beta$  oxydation des acides gras, gluconéogenèse, formation de la bile et du cholestérol et catabolisme des acides aminés).

La **zone 2** concerne les hépatocytes situés dans la région péricentrale entre la zone 1 et la zone 3.

La **zone 3** est celle des hépatocytes situés dans la région centrolobulaire, distante des espaces portes. Cette zone est la moins bien perfusée et joue un rôle important dans la détoxification, la biotransformation des drogues, la céto-genèse, la glycolyse, la lipogenèse, la synthèse du glycogène et la formation de glutamate (**Figure 2.3**).



**Figure 2.3. – Coupe histologique de foie humain représentant le lobule hépatique et l'espace porte [4].**

## **2.2. Rôle physiologique du foie**

### **2.2.1. La fonction métabolique**

#### **2.2.1.1. Métabolisme des hydrates de carbone**

Le foie régule le taux de glucose dans le sang soit en stockant le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), soit en dégradant le glycogène (glycogénolyse). Il peut également former du glucose à partir de précurseurs non glucidiques (précurseurs gluconéogéniques): acides aminés et lactate essentiellement.

#### **2.2.1.2. Métabolisme des lipides**

Le foie permet la synthèse d'acides gras, de triglycérides et de phospholipides, la synthèse du cholestérol, la synthèse des VLDL (lipoprotéines de très basse densité), la biotransformation de chylomicrons en LDL et HDL. Le foie oxyde les acides gras provenant du tissu adipeux pour produire de l'énergie et des équivalents réducteurs (NADH). Cette énergie et ces équivalents réducteurs peuvent être utilisés pour la gluconéogenèse. D'autre part, l'oxydation hépatique des acides gras permet la synthèse des corps cétoniques qui comme le glucose produit par le foie représentent des substrats énergétiques utilisables par les tissus extra-hépatiques.

#### **2.2.1.3. Métabolisme des protéines**

Le foie capture les acides aminés de la circulation en vue de leur utilisation pour la synthèse des protéines, la néoglucogénèse ou encore la synthèse de métabolites (glutathion à partir de cystéine).

Le foie contribue à la synthèse de nombreuses protéines sanguines et joue un rôle majeur dans la teneur sanguine en protéines. Les protéines synthétisées par le foie incluent :

- L'albumine : représentant 55% des protéines plasmatiques.
- Des protéines glycosylées : protéines de l'inflammation (CRP) et protéines de la coagulation et de la fibrinolyse.
- Des globines : hémoglobine, globuline...

- Des protéines de transport du fer (transferrine), du cuivre (céruloplasmine) ou encore des hormones thyroïdiennes.
- Des facteurs de croissance.

Le foie est donc capable de protéogénèse. Il est aussi capable d'aminocidogénèse et peut aussi synthétiser des acides aminés non essentiels à partir d'acides aminés essentiels (synthèse de glutamine à partir de valine ou d'isoleucine). Le foie utilise localement ou libère les acides aminés dans la circulation pour leur captation par les tissus périphériques. Le foie peut aussi neutraliser la charge ammoniacale des acides aminés sous forme d'urée éliminable par voie rénale via le cycle de l'urée.

### **2.2.2. Le métabolisme des micronutriments**

Les vitamines liposolubles sont solubilisées dans la bile avant d'être absorbées, le foie joue un rôle essentiel dans la biodisponibilité des vitamines liposolubles : A, D, E, K et est le lieu de stockage de ces vitamines (vitamine A dans les cellules de Ito).

Les vitamines A et D doivent être métabolisées par le foie pour obtenir leur forme active. La vitamine K est indispensable à l'activité biologique (fixation au calcium) des facteurs de coagulation II, VII, IX, X, protéine C et protéine S.

### **2.2.3. Le métabolisme de la bilirubine**

Le foie joue un rôle essentiel dans l'élimination de l'hème de l'hémoglobine. L'hème est transformé en biliverdine puis en bilirubine non conjuguée ou bilirubine libre indirecte (substance liposoluble et neurotoxique). Le foie reçoit la bilirubine non conjuguée liée à l'albumine provenant de la circulation sanguine. La bilirubine non conjuguée est captée par les hépatocytes et conjuguée par l'*uridine diphosphate glucuronyltransferase* (UGT) pour devenir hydrophile et non neurotoxique et être sécrétée dans la bile ou dissoute, en faible quantité dans le sang et être éliminée par les reins. Une faible quantité est convertie en urobilinogène par les bactéries du tube digestif (colon) et peut être réabsorbée : c'est le cycle entéro-hépatique.

### **2.2.4. Le métabolisme des drogues**

La plupart des substances sont lipophiles, hydrophobes, partiellement ionisées à pH physiologique et/ou liées aux protéines plasmatiques. Le foie joue un rôle important dans la détoxification et le métabolisme des drogues en transformant ces molécules soit en substances inactives soit en molécules capables d'être éliminées par la bile ou par les reins.

Deux catégories de toxines peuvent être définies et éliminées par le foie :

- Les toxines endogènes qui sont des substances sécrétées par l'organisme et qui doivent être éliminées car leur accumulation peut être toxique. C'est le cas des déchets du métabolisme comme l'acide lactique, les produits de dégradation de l'hémoglobine, l'ammoniaque.
- Les toxines apportées à l'organisme comme :
  - Les toxines microbiennes du tube digestif.
  - Les toxines de l'environnement : polluants, additifs alimentaires, pesticides.
  - Les médicaments.
  - L'alcool, les métaux lourds.

La clearance hépatique d'une drogue (quantité de sang totalement épurée de la substance par unité de temps) dépend du débit sanguin hépatique et du coefficient d'extraction hépatique de la molécule.

Le foie peut éliminer les drogues par l'intermédiaire des lysosomes mais la voie principale de métabolisme des drogues est la biotransformation. Deux sets de réactions permettent au foie de transformer une drogue liposoluble en substance hydrosoluble. Les *réactions de phase I* impliquent classiquement le cytochrome P450. Les *réactions de phase II* permettent la conjugaison du métabolite créé par la phase I pour le rendre plus hydrophile et donc permettre sa sécrétion dans le sang ou la bile. Trois types majeurs de conjugaison sont décrits : les conjugaisons par le glucuronate (réticulum endoplasmique), le sulfate (cytosol) et le glutathion (cytosol, mitochondrie).

### **2.2.5. Production, composition et rôles de la bile**

La synthèse de la bile est continue, elle est sécrétée dans les canalicules biliaires puis vers le duodénum ou peut être stockée dans la vésicule biliaire. La quantité de bile libérée dans le duodénum est de 500-800 ml/ 24h et est conditionnée par les pressions régnant dans la vésicule et le sphincter d'Oddi.

La composition de la bile produite par les hépatocytes comprend de l'eau, des électrolytes ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), des sels biliaires (stéroïdes dérivés de l'acide cholique conjugué à des acides aminés : taurine et glycine), du cholestérol, des pigments biliaires, de la bilirubine et des phospholipides. La bile a un pH basique : 7,6 à 8,6 permettant de neutraliser l'acidité gastrique.

Dans l'intestin, les acides biliaires sont métabolisés par le microbiote et réabsorbés par la muqueuse intestinale : c'est le cycle entéro-hépatique (98% de réabsorption). Seulement 2% des acides biliaires sont éliminés dans les selles [3].

Les rôles de la bile sécrétée par le foie sont nombreux et incluent la formation de micelles permettant l'action de la lipase pancréatique et l'absorption des lipides, l'absorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K), la captation de la vitamine B12, le maintien d'un équilibre de pH au niveau du duodénum, la sécrétion d'immunoglobulines, l'excrétion du cholestérol, de la bilirubine, des protéines, des xénobiotiques.

#### **2.2.6. La fonction de défense et de filtre**

De par sa situation, le foie reçoit 75% de son apport sanguin de l'intestin et de la rate via la veine porte. Il est donc, en permanence, exposé aux agents pathogènes et aux antigènes alimentaires.

De plus, les lymphocytes de la rate doivent traverser les sinusoides hépatiques pour atteindre la circulation systémique. Le foie est donc un organe essentiel dans la régulation de la réponse immunitaire et doit être capable de déployer des mécanismes de tolérance immune tout en maintenant une capacité de réponse efficace en cas d'agression. Les pores fenestrés des cellules endothéliales constituent un élément essentiel dans l'interaction des hépatocytes avec les cellules du système immunitaire [5].

Le foie possède un système réticulo-endothélial et des macrophages résidents nommés cellules de Kupffer capables de capter des débris cellulaires, des bactéries, des endotoxines provenant du courant sanguin et de les éliminer. C'est l'immunité cellulaire [6,7]. Le foie possède également des cellules mononucléées: lymphocytes, plasmocytes qui jouent un rôle important dans l'immunité humorale grâce à la sécrétion d'anticorps.

### **2.3. Bibliographie**

- (1) <https://medecinefa.wordpress.com/la-segmentation-hepatique>
- (2) <https://www.anat-jg.com>
- (3) <https://www.nicolas-aubineau.com/fonctions-foie>
- (4) <https://es.slideshare.net/laamlove/le-foie-vbiliairespanc>
- (5) Lapierre P, Alcaez F. Le foie : un organe du système immunitaire ? Med Sci. 2007 November; 23(11): 985–990.
- (6) <https://reanesth.chu-bordeaux.fr>
- (7) Kalra A, Tuma F. Physiology, liver. Treasure Island (FL): StatPaerls Publishing ;2020.

## CHAPITRE 3 : LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL (FOIE ISOLÉ DE RAT)

### 3.1. Introduction

C'est au 19<sup>ème</sup> siècle (1855-1857) que Claude Bernard fut le premier à rapporter l'utilisation du modèle de foie de rat isolé en étudiant la production hépatique de glucose au départ du glycogène sur des foies lavés d'animaux morts [1,2].

Le modèle de perfusion de foie isolé est utilisé, depuis de nombreuses années, pour l'étude *in vitro* des mécanismes physiologiques, biochimiques et pharmacologiques du foie tout en excluant l'influence d'autres systèmes. Il permet une évaluation des lésions cellulaires et de la fonction hépatique [3]. Il est également utilisé dans des études de préservation d'organe, d'ischémie-reperfusion [4,5], de transplantation hépatique [6], de la fonction endothéliale et de la consommation d'oxygène [3] et a permis de modéliser l'hypertension portale [7,8] et d'étudier la physiopathologie des lésions liées à la consommation aiguë et chronique d'alcool [9]. Il a été utilisé dans le cadre du traitement des métastases hépatiques par l'administration de chimiothérapie ou de Tumor necrosis factor (TNF) via l'artère hépatique chez l'être humain [10].

Le modèle de foie isolé a permis de comprendre les mécanismes de cytolysse liés au phénomène de reperfusion d'organe transplanté, seconde cause de dysfonction des greffons après le rejet immunologique mais également d'étudier les méthodes de transplantation et de préservation d'organes. Les solutions de perfusion du foie isolé peuvent être de diverses natures : du sang, des macromolécules telles l'albumine, des transporteurs d'oxygène mais également des solutions salines tampons [11]. La solution de perfusion la plus communément utilisée est la solution tampon de Krebs-Henseleit sans adjonction d'albumine [3].

La vitesse de perfusion ainsi que la durée de perfusion varient selon les études. Elles restent, cependant, un compromis entre un flux élevé pouvant causer des lésions cellulaires de l'endothélium vasculaire et un flux faible responsable de la dégénération vacuolaire des hépatocytes. Le flux doit permettre une oxygénation hépatique optimale et éviter les lésions cellulaires. L'examen en microscopie électronique du foie de rat perfusé durant 70 minutes ne montre pas de dégénérescence vacuolaire ni de ballonnement cellulaire démontrant le maintien de la structure fine du foie dans ce modèle [11].

Il a démontré par Bradford et al. qu'une perfusion de 120 minutes du modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo* n'entraînait pas, si les conditions de perfusion étaient optimales et constantes, de lésions d'hypoxie et de lyse cellulaire quel que soit le statut nutritionnel du rat avant l'expérimentation [12].

Le modèle de foie perfusé *ex-vivo* est le plus fréquemment utilisé avec perfusion isolée de la veine porte. La distribution physiologique du flux entre veine porte (75%) et artère hépatique (25%) fait que les modèles de perfusion veine porte/artère hépatique ne sont utilisés que dans des études très spécifiques [13].

Nous avons délibérément décidé d'utiliser le modèle de perfusion du foie sans éléments figurés, ni protéines afin d'éviter les interactions possibles du métabolisme des globules rouges et le risque d'allo réaction. Dans ce cadre, le modèle permet l'évaluation de l'effet du statut nutritionnel de l'animal sans aucune autre interaction de la solution perfusée mais également l'évaluation de l'effet de substrats nutritionnels, de molécules chimiques et d'états de stress comme le phénomène d'ischémie-reperfusion. Le modèle de perfusion isolée du foie avec une solution « hémoglobine free » permet l'évaluation constante des paramètres métaboliques liés à l'organe seul, ainsi que les mécanismes de protection développés pour sa survie. Dans le cadre de l'étude des phénomènes d'ischémie-reperfusion et de transplantation, la standardisation de ce modèle permet une étude plus performante et une réduction du nombre d'animaux nécessaires.

### 3.2. Le foie de rat

Le modèle mammifère le plus fréquemment utilisé est celui du rongeur. Le rongeur est très résistant à la reproduction successive avec une variation génétique faible entre les animaux. Leur rapide cycle de reproduction permet une récolte de grandes quantités de données, leur maniabilité est simple de par leur petite taille et leur coût et maintenance

restent faibles. De plus, ils offrent la possibilité de modification génétique permettant l'étude spécifique de voies métaboliques [9].

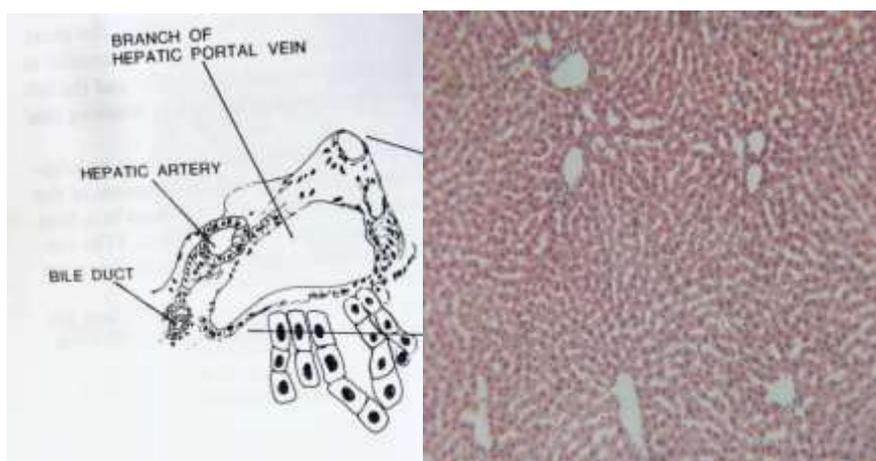
Le rat de laboratoire est un des modèles expérimentaux les plus populaires en recherche expérimentale. Les structures anatomiques des organes sont relativement identiques à celles de l'homme [14].

### **3.2.1. Différences entre le foie de rat et le foie humain**

Le foie de rat est divisé en 6 lobes : le lobe médial gauche et droit, le lobe cystique, le lobe latéral gauche et droit et le lobe quadraté. Chez l'homme, il existe 2 grands lobes : le lobe droit et le lobe gauche et 2 lobes plus petits : le lobe carré et le lobe caudé. Chez le rat, il représente 6% du poids de l'animal chez l'homme, 2% du poids du corps. Les rats n'ont pas de vésicule biliaire contrairement à l'homme. Les canalicules biliaires se rejoignent pour former le *ductus hepaticus communis* qui s'ouvre dans le duodénum. Les rats ne possèdent pas de cholédoque proprement dit, ni de canal cystique. Le conduit biliaire droit reçoit la bile des lobes droit et caudé, le gauche draine la bile des lobes gauche et quadraté. Tout comme chez l'homme, le foie est constitué de rangées d'hépatocytes disposées de manière radiaire autour d'une région centrale : l'espace porte. Cet espace porte est constitué d'une branche de la veine porte, de l'artère hépatique, d'un canal biliaire et de vaisseaux lymphatiques (**Figure 3.1**).

L'artère hépatique provient de l'artère cœliaque qui donne également l'artère splénique et l'artère gastrique gauche. Au niveau du hile hépatique, l'artère hépatique se divise en branches droite et gauche pour donner les artères des espaces portes dont le parcours intrahépatique est parallèle au réseau porte.

Les veines hépatiques entrent dans la veine cave inférieure lorsque celle-ci passe dans le foie. Il existe 4 veines hépatiques drainant chacune un lobe. Ces veines hépatiques proviennent de l'union des veines centrolobulaires.



**Figure 3.1. – Représentation schématique (gauche) et coupe histologique colorée à l'hématoxyline (x10) (droite) d'un espace porte (foie de rat).**

La circulation sanguine et la circulation de la bile vont, comme chez l'homme, en sens opposé au sein des lobules hépatiques.

Il n'y a pas de différence majeure, hormis l'absence de vésicule biliaire, entre l'anatomie du foie de rat et celui de l'homme [15].

### **3.2.2. Choix du sexe des rats**

Des rats Wistar femelles ont été utilisés dans ce modèle : rats souvent utilisés pour l'étude des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Le choix des rats femelles malgré l'interaction hormonale possible dans la réponse aux variations de statuts nutritionnels repose sur leur utilisation dans les expérimentations de référence aux mêmes âges et dans les mêmes conditions expérimentales.

### **3.2.3. Conditions de perfusion**

Le flux sanguin hépatique *in vivo* est de 0,5 à 2 ml/ minutes/ gramme de foie et la pression dans la veine porte est de 8-10 mm Hg. Cette vitesse (max 5 ml/min/gramme de foie) et cette pression (max 12 cm H<sub>2</sub>O) du foie peuvent être contrôlées expérimentalement. Au-delà de la pression maximale mentionnée, il existe un risque de barotrauma avec fuite de particules au travers des fenestrations élargies des cellules endothéliales. En deçà de cette pression, un risque d'hypoperfusion peut entraîner des lésions de cytolysse et fausser les résultats expérimentaux [3]. Nous avons fait le

choix de travailler à vitesse de 5 ml/min en respectant une pression de perfusion moyenne de 12 cm d'H<sub>2</sub>O qui maintient l'homéostasie vasculaire du foie.

Le perfusé est administré en circuit fermé ce qui permet une conservation des métabolites libérés et leur accumulation jusqu'à l'obtention de valeurs mesurables. Des contrôles de stabilité du perfusé : pH, oxygénation ont été effectués durant les expérimentations.

### **3.3. Le modèle murin de foie perfusé *ex-vivo***

#### **3.3.1. Animaux**

Des rats femelles Wistar, d'environ 200g et 12 semaines sont utilisés dans toutes les expérimentations. Les rats sont installés dans des cages spécifiques de l'animalerie et acclimatés avec un cycle jour-nuit de 12h-12h. Ils ont été nourris avec de la nourriture standard de laboratoire et ont un accès illimité à l'eau. Les rats sont, soit nourris ad libitum soit, mis à jeun 18h ou 24h avant le début des expérimentations selon le groupe.

#### **3.3.2. Anesthésie**

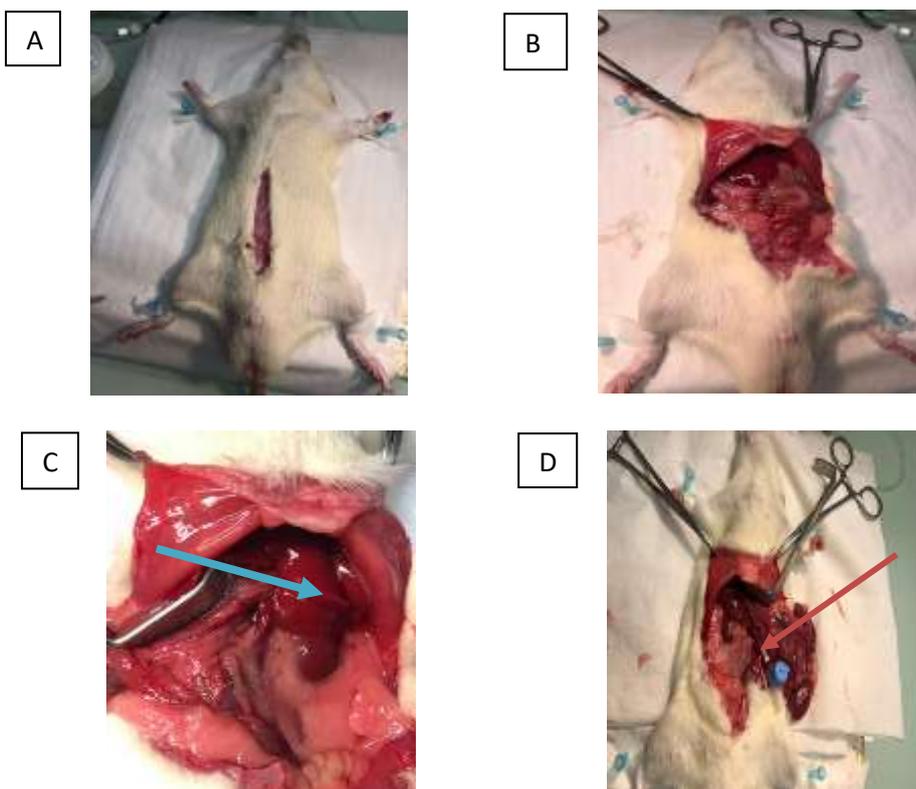
Les rats sont anesthésiés par une injection de 50mg/kg de pentobarbital sodique en intrapéritonéale [16].



**Figure 3.2. – Anesthésie par voie intrapéritonéale (gauche) et ventilation du rat placé dans le champ opératoire (droite).**

#### **3.3.3. Dissection et perfusion**

La profondeur de l'anesthésie est évaluée avant le début de l'expérimentation. Le rat est placé sur le dos avec fixation des 4 extrémités. L'abdomen est ouvert par une laparotomie médiane sur la ligne blanche afin d'éviter les saignements importants. Les intestins sont réclinés vers la gauche afin de libérer la veine porte, la veine cave inférieure et l'aorte. Deux fils de soie sont placés autour de la veine porte pour fixer un cathéter. De l'héparine 5000 UI/kg est administrée par la veine cave inférieure afin d'éviter la formation de thrombus. La veine porte est canulée par un cathéter 22 gauge et celui-ci est fixé par l'intermédiaire des fils de soie préalablement placés. Le cathéter est relié à la perfusion et à la pompe péristaltique qui délivre la solution de perfusion à une vitesse de 5 ml/min. L'animal est euthanasié par choc hémorragique en ouvrant la veine cave inférieure immédiatement après le début de la perfusion afin d'éviter le gonflement cellulaire. Le foie est ensuite disséqué, isolé et placé dans le système fermé de perfusion continue. La pression dans le système est contrôlée et maintenue en moyenne à 12 cm d'H<sub>2</sub>O, le volume du circuit est de 125 millilitres et la température est de 37°C. Le foie est perfusé durant 135 minutes. Une ischémie-reperfusion soit, chaude de 60 min à 37°C soit, froide de 24h à 4°C peut être appliquée au modèle, le foie est alors perfusé durant 60 minutes puis subit une ischémie, pour être reperfusé durant 120 minutes.



**Figure 3.3. – Intervention chirurgicale précédant le prélèvement du foie. A : laparotomie médiane sur la ligne blanche, B : ouverture de l'abdomen, C : exposition du foie (flèche bleu), des veines cave inférieure et porte, D : pose du cathéter dans la veine porte (flèche rouge).**

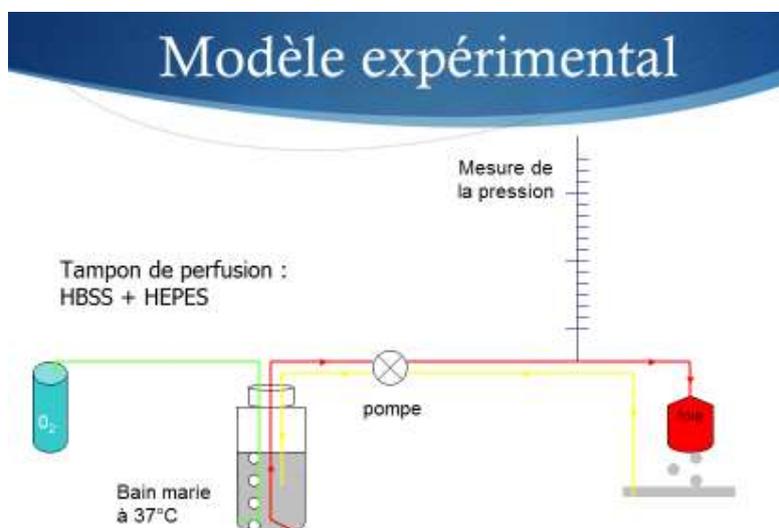
### 3.3.4. La solution de perfusion

La solution de perfusion choisie est hémoglobine-albumine free. Elle est composée d'une solution balancée de Hank (HBSS) contenant 0,4 g/L de KCl, 0,06 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,35 g/L de  $\text{NaHCO}_2$ , 0,048 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et de 0,14 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . De l'HEPES est ajoutée à la solution 2,38 g/L. La solution est saturée en oxygène 0,5 L/min à 100%, le pH est ajusté à  $7,35 \pm 0,05$  par du NaOH 1M, l'osmolarité est de 300 mOsmoles.

La solution de perfusion peut être implémentée par l'ajout de substrats énergétiques ou de molécules chimiques selon les besoins des expérimentations.

### 3.3.5. Le schéma du modèle expérimental

La circuiterie du modèle expérimental avec perfusion du foie de rat, le foie cathétérisé et isolé dans l'enceinte expérimentale, est présentée à la **figure 3.4**.



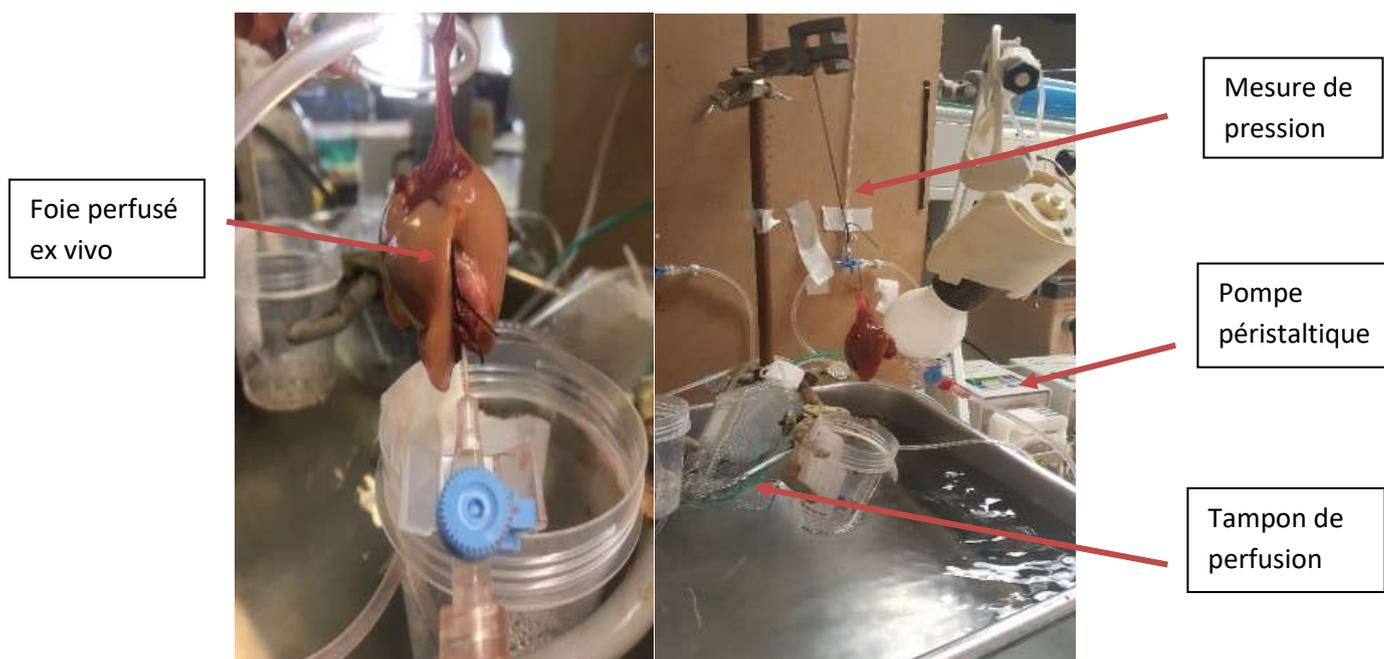


Figure 3.4. – Schéma expérimental de perfusion du foie isolé. Photos illustrant le dispositif en conditions réelles.

### **3.3.6. Prélèvements et biopsies**

#### **3.3.6.1. Mesures des paramètres de cytolysse hépatique et des métabolites**

Des prélèvements de la solution de perfusion sont réalisés toutes les 15 minutes depuis le temps zéro, correspondant à la mise en perfusion dans le système *ex-vivo* fermé, jusqu'à 135 minutes correspondant à la fin des expérimentations. Ces prélèvements sont utilisés pour le dosage des métabolites : glucose et lactate, du potassium et les enzymes de cytolysse hépatiques : GOT (AST), GPT (ALT), LDH.

La cytolysse hépatique se marque par une libération des enzymes hépatiques dans le perfusé. L'aspartate aminotransférase AST n'est pas spécifique du foie mais reste un marqueur de lyse cellulaire des hépatocytes, lorsque le rapport AST/ALT est supérieur à 1, la lyse est plus sévère car la présence d'AST est à la fois cytoplasmique et mitochondriale. Lorsque le rapport AST/ALT est inférieur à 1, la lyse cellulaire est considérée moins importante du fait de la localisation uniquement cytoplasmique de l'alanine aminotransférase (ALT) au sein des hépatocytes.

La lactate déshydrogénase (LDH) permet l'interconversion du lactate en pyruvate. Il s'agit d'une enzyme non spécifique du foie, elle se retrouve également dans les autres types cellulaires présents dans le foie et est considérée comme un marqueur de lyse cellulaire global.

#### **3.3.6.2. Mesures additionnelles**

Des biopsies sont prélevées au temps zéro et 135 minutes pour le dosage de l'ATP, l'immunohistochimie, les dosages des protéines du processus cellulaire d'intérêt, la coloration PAS (acide périodique schiff).

L'adénosine triphosphate est un paramètre mesuré pour évaluer le métabolisme énergétique. L'ATP est produite par la phosphorylation oxydative et par la glycolyse. Dans la plupart des études, il y a une évaluation de la charge énergétique par la mesure soit du rapport  $(ATP + \frac{1}{2} ADP) / (AMP + ADP + ATP)$  soit par le rapport  $(ATP / (ADP + Pi))$  [17].

### **3.3.7. Phénomènes d'ischémie-reperfusion**

Les phénomènes d'ischémie-reperfusion se marquent par 2 phases distinctes. La phase d'ischémie proprement dite liée à la déplétion en adénosine triphosphate, la dysfonction membranaire, le ballonnement cellulaire [18], les lésions du cytosquelette [19], l'altération de l'homéostasie calcique et la production d'hypoxantine [20] et la phase de reperfusion liée à la réoxygénation de l'organe avec production d'espèces activées de l'oxygène dont les radicaux superoxydes entraînant des lésions microvasculaires et une détérioration de la perfusion adéquate des tissus [21].

L'application de phénomène d'ischémie-reperfusion au modèle peut donc déstabiliser l'équilibre cellulaire et aggraver les lésions de cytolysse pouvant résulter d'un statut nutritionnel donné.

### **3.4. Bibliographie**

- (1) Gores G, Kost L, LaRusso N. The Isolated Perfused Rat Liver: Conceptual and Practical Considerations. *Hepatology* 1986, vol 6, No 3, 511-517.
- (2) Bernard C. Nouvelle fonction du foie considéré comme organe producteur de matière sucrée chez l'homme et les animaux. Paris, Baillière, 1853, 92 p. (Thèse pour le doctorat en Sciences naturelles).
- (3) Bessems M, 't Hart. NA, Tolba.R, Doorschodt.BM, Leuvenink.HGD, Pleog RJ, Minor.T, van Gulik.TM. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Laboratory Animals*. 2006, 40: 236-246.
- (4) Domenicali M, Vendemiale G, Serviddio G, Grattagliano I, Pertosa AM, Nardo B, Principe A, Viola A, Trevisani F, Altomare E, Bernardi M, Caraceni P. Oxidative injury in rat fatty liver exposed to ischemia-reperfusion is modulated by nutritional status. *Dig Liver Dis*. 2005 Sep;37(9):689-97.
- (5) Caraceni P, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Grattagliano I, Principe A, Palasciano G, Trevisani F, Bernardi M. The nutritional status modulates preservation-reperfusion injury in rat fatty liver. *J Surg Res*. 2005 Aug; 127(2):190-6. Epub 2005 Apr 14.
- (6) Lopes FSC, Cartucho DJF, Cabrita AMS, Patrício JAB: Techniques of intestinal transplantation in rat. *Microsurg*, 1998, 7: 424–29.
- (7) Xu XY, Zhou H, Zhao X, Song M, Zhang TT, Yin H, Li T, Li PT, Cai DY. A pharmacodynamic model of portal hypertension in isolated perfused rat liver. *World J Gastroenterol*. 2012 Feb 7; 18(5):472-8.
- (8) Barry Alexander · Camilla Rogers · Richard Naftalin. Hepatic arterial perfusion decreases intrahepatic shunting and maintains glucose uptake in the rat liver. *Eur J Physiol* (2002) 444:291–298).
- (9) Lamas-Paz A, Hao F, Nelson LJ, Vázquez MT, Canals S, Gómez Del Moral M, Martínez-Naves E, Nevzorova YA, Cubero FJ. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J Gastroenterol*. 2018 Dec 7; 24(45):5063-5075.
- (10) Oldhafer K, Lang H, Frerker M, Moreno L, Chavan A, Flemming P, Nadalin S, Schmoll E, Pichlmayr R. First experience and technical aspects of isolated liver perfusion for extensive liver metastasis. *Surgery*, 1997. Vol 123 (6): 622-630).
- (11) Sugano T, Suda K, Shimada M, Oshino N. Biochemical and ultrastructural Evaluation of Isolated Rat Liver Systems perfused with a Hemoglobin-Free Medium. *J.Biochem*. 1978: 83,995-1007.
- (12) Bradford BU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG. New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986 Jan; 236(1):263-8).
- (13) Gardemann A, Jahns U, Jungermann K (1991) Control of glycogenolysis and blood flow by arterial and portal norepinephrine in perfused liver. *American Journal of Physiology* 260(5 Part 1), E762–771.
- (14) Vdoviaková K, Vdoviaková K, Petrovová E, Krešáková L, Maloveská M, Teleky J, Jenčová J, Živčák J, Jenča A Jr. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Med Sci Monit*. 2016 Dec 2; 22:4716-4728.
- (15) Chiasson R. *Laboratory anatomy of the white rat*. 1958 WCB fifth edition: pages 61, 70, 72.
- (16) Waynforth.H.B, Flecknell.P.A. *Experimental and surgical technique in the rat*. Second edition. Elsevier. 2004: 23.
- (17) Groen AK, Vervoorn RC, Wanders RJ, Van der MR, Tager JM (1982) An evaluation of the metabolite indicator method for determining the cytosolic phosphate potential in rat liver cells. *Biochimica and Biophysica Acta* 721, 172–7.
- (18) Belzer.FO, Southard.JH.Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988, 45,673-6.
- (19) Lemasters JJ, Thurman RG. The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology*, 1995; 108, 1317–20.
- (20) Bellomo G, Orrenius S (1985) Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5, 876–82.
- (21) Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *American Journal of Pathology*, 1994; 145, 1421–31.

# CHAPITRE 4 : L'AUTOPHAGIE

## 4.1. Définition

L'autophagie, également nommée autolyse ou autophagocytose, est un mécanisme physiologique de recyclage et de protection mis en place par les cellules elles-mêmes. Le nom « autophagie » provient du grec :  $\alpha\upsilon\tau\omicron$  signifiant « soi-même » et  $\varphi\alpha\gamma\epsilon\acute{\iota}\nu$  signifiant « manger » [1]. L'autophagie est une voie majeure du catabolisme cellulaire dans laquelle les lysosomes peuvent dégrader des macromolécules et des organites cellulaires. Cette dégradation obéit à un double objectif : l'élimination des constituants cellulaires âgés ou altérés (rôle de contrôle de qualité) et la restitution des petites molécules élémentaires constitutives (acides aminés, acides gras, hydrates de carbonés) des édifices macromoléculaires ainsi détruits à des fins énergétiques (rôle énergétique de l'autophagie).

L'autophagie peut être déclenchée par des conditions de stress extracellulaire: déficit nutritionnel, hypoxie, stress oxydant mais également par des conditions de stress intracellulaire : stress du réticulum sarcoplasmique, accumulation d'organelles endommagées ou d'agrégats protéiques [2].

## 4.2. Origine

La morphologie de l'autophagie a été identifiée, chez les mammifères, dans les années 50 par l'observation des cellules en microscopie électronique. C'est en 1956 que Novikoff et al. sont les premiers à observer, en microscopie électronique, ces structures à double membrane contenant mitochondries et parties du réticulum sarcoplasmique [3].

En 1963, au symposium de la Fondation sur les lysosomes, Christian De Duve propose pour la première fois le terme d'autophagie en observant que, lors du jeûne, les cellules digéraient une partie de leur propre contenu [4].

Depuis, l'intérêt scientifique porté à ce mécanisme a suscité de nombreuses publications visant à en identifier les caractéristiques et mécanismes de même que le rôle joué dans des phénomènes physiopathologiques.

Le prix Nobel de Chimie de 2004 portait sur la découverte du rôle de l'ubiquitine dans le processus de dégradation des protéines. Le docteur Japonais Yoshino Ohsumi reçut le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2016 pour ses recherches sur l'autophagie [5].

Les gènes de la famille des ATG (ATG pour AuTophagie) impliqués dans l'autophagie sont au nombre de 33 et leurs séquences restent très conservées au cours de l'évolution au sein des diverses espèces capables d'autophagie. Ces gènes sont impliqués à différents niveaux du processus autophagique [6].

## 4.3. Types d'autophagie

On distingue classiquement 3 types de processus autophagiques: l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, la microautophagie et la macroautophagie.

- *L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes* est capable de reconnaître sélectivement des protéines cytosoliques à domaine KFERQ, d'amener ces protéines et des les transloquer, grâce à des protéines chaperonnes : HSPA8, au sein des lysosomes pour y être dégradées [7,8].
- La *microautophagie* est une phagocytose directe du matériel cytoplasmique par la membrane lysosomale.
- La *macroautophagie* fait initialement intervenir la formation d'une vacuole à double membrane, l'autophagosome, qui fusionnera avec le lysosome : l'autophagolysosome (ou autolysosome) responsable de la dégradation du matériel séquestré par les enzymes lysosomales [9]. Finalement, grâce aux perméases membranaires lysosomales, les molécules qui sont produites peuvent rejoindre le cytoplasme pour y être réutilisées [10,11]. L'autophagosome prend naissance à partir d'une membrane appelée phagophore, l'intervention des gènes liés au codage des protéines Atg de l'autophagie est nécessaire pour la nucléation et l'élongation de cette membrane [2].

Les micro- et macro-autophagies peuvent être non sélectives mais peuvent également être très sélectives vis-à-vis des organelles, des gouttelettes lipidiques, des agrégats protéiques ou des microorganismes présents dans le cytoplasme des cellules [1].

Il existe différents types d'autophagie sélective, on parle alors de mitophagie lorsque l'autophagie est dirigée sur les mitochondries, de glycofagie lorsqu'elle touche le glycogène, de ribophagie lorsqu'elle touche les ribosomes, de pexophagie lorsqu'elle touche les peroxisomes [10].

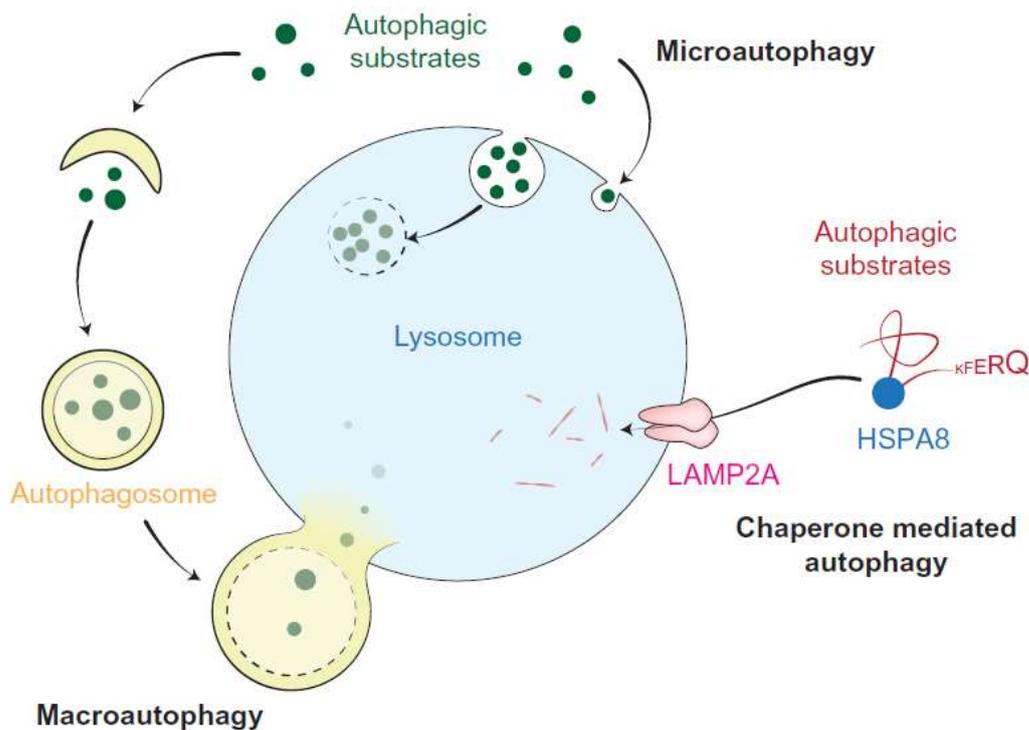


Figure 4.1- Types d'autophagie chez les mammifères. La microautophagie, invagination directe de la membrane des lysosomes ; l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes dépendant de la translocation via LAMP2A ; la macroautophagie nécessitant la formation d'autophagosome avant la fusion avec les lysosomes [8].

#### 4.4. L'autophagie

Le processus de macroautophagie ou autophagie englobe les étapes s'étalant de la formation du phagophore à la fusion de celui-ci avec les lysosomes et inclut la dégradation du matériel présent dans l'autophagolysosome. Comme déjà mentionné, ce processus est étudié par les biologistes depuis les années 50 et fait intervenir à chacune de ses étapes des protéines spécifiques appelées : Atg (autophagy-related proteins).

Les caractéristiques de l'autophagie sont :

- La présence de vésicules autophagiques à double membrane dans le cytoplasme
- La condensation partielle de la chromatine du noyau
- L'indépendance vis-à-vis des caspases
- L'activité lysosomale accrue liée à l'autophagie
- La nature régulée du processus (comme l'apoptose) en principe associée à l'absence de déclenchement de la réaction inflammatoire

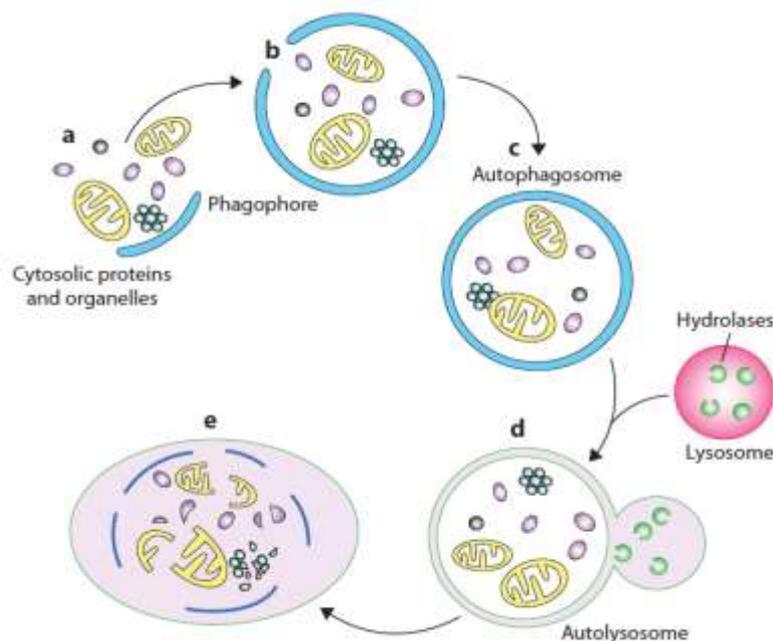


Figure 4.2 – Schéma général de l'autophagie [12].

#### 4.4.1. Initiation et nucléation de la membrane

Le complexe ULK 1/2, le complexe hVPS34, les systèmes de conjugaison de type ubiquitine ATG5-ATG12 et le MAP1LC3-PE sont les unités fonctionnelles de la formation de l'autophagosome [13].

Chez les mammifères, l'initiation et la formation de l'autophagosome suite à un stress, tel que le jeûne, débute au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par la formation d'un omégasome. Différents organelles intracellulaires (RE, appareil de Golgi, mitochondries *via* les MAMs (mitochondria-associated membranes)) ainsi que le complexe Atg9 permettent la formation du phagophore soit par contact membranaire direct soit par l'intermédiaire de protéines ou de lipides.

La sérine thréonine kinase des mammifères mTOR (mammalian Target Of Rapamycine), cible biologique/pharmacologique de la rapamycine, un agent immunosuppresseur, est un senseur majeur du statut nutritionnel. Elle est inhibée en cas de jeûne ou de dénutrition, surtout lors d'un manque en acides aminés et son inhibition induit l'autophagie [14].

La **figure 4.3** représente les différentes étapes de l'initiation de l'autophagie. La suppression de mTOR entraîne la déphosphorylation d'Atg13, son association subséquente avec ULK1/2 et la translocation du complexe ULK activé (ULK1/2, Atg13, FIP200 (RB1CC1), Atg 101) du cytoplasme vers la membrane du RE. Le complexe ULK recrute et active alors le complexe PI3K de classe III (hVps34, PI3KC3, hVps15, Bécline1, Atg 14) au niveau de la membrane nucléée. Il y a alors production de PI3P qui induit à son tour le recrutement de DFCP1 et WIPI pour former un omégasome. La synthèse continue de PIP3 engendre une boucle de rétrocontrôle positive qui renforce le recrutement du complexe ULK1/2 à la membrane et stimule l'expansion de l'omégasome. L'Atg9 des vésicules de l'appareil de Golgi se déplace vers le RE et l'interaction entre VMP1 et le complexe PI3K de classe III apporte les constituants lipidiques nécessaires à la formation et à la nucléation de la vacuole d'autophagie [15,16].

L'inhibition du complexe mTORC1 favorise également la transcription de gènes lysosomaux et autophagiques impliqués dans l'induction de l'autophagie et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome par activation du facteur de transcription TFEB. L'ULK 1/2 interagit avec des facteurs autophagiques dont l'expression est stimulée par TFEB [17,18].

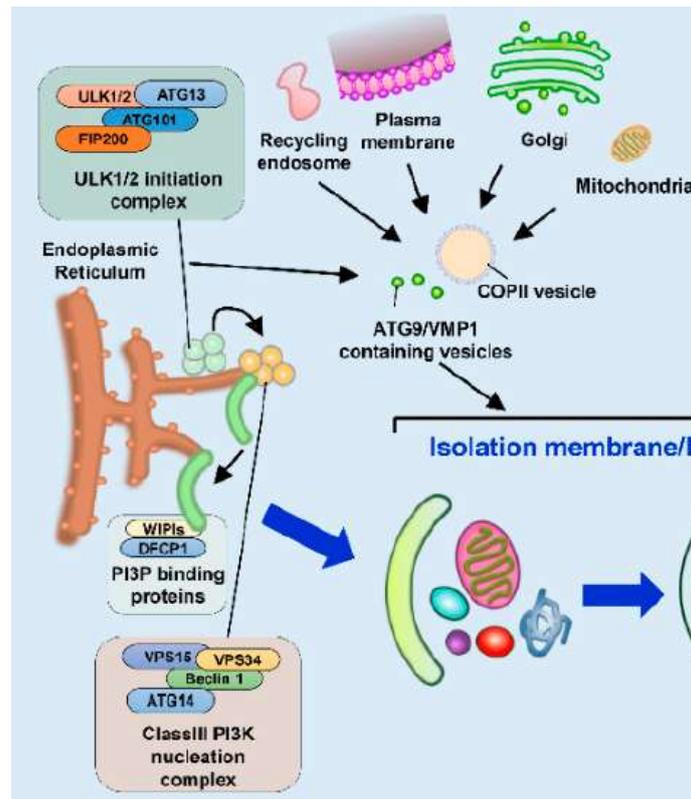


Figure 4.3– Phase d'initiation de l'autophagie [15].

#### 4.4.2. Elongation de la membrane

L'allongement et la fermeture du phagosome dépendent de 2 systèmes de conjugaison de type ubiquitine : MAP1LC3-PE (LC3-II) et Atg5-Atg12. L'Atg7 et l'Atg10 favorise la formation du complexe Atg12-Atg5. Secondairement, ce complexe s'associe avec Atg16L1.

La région C-terminale de la protéine LC3 cytosolique est clivée par l'Atg4 pour générer le LC3-I. L'Atg7 et l'Atg3 permettent la lipodation du LC3-I pour former le LC3-II. Les complexes LC3-II et Atg5-Atg12-Atg16L coopèrent pour maturer l'autophagosome et permettre l'élongation et la fusion de la membrane en favorisant la conjugaison du LC3-II à la phosphatidyléthanolamine. Le LC3-II est alors capable de se lier soit à des molécules possédant un domaine autophagique LIR ou à des protéines cargos telles que SQSTM1 (p62) [8,19]. Ce procédé peut agir comme un mécanisme de dégradation non sélective de composants cytosoliques mais peut également être très sélectif grâce au lien entre LC3-II et p62/SQSTM1 (Figure 4.4).

La fusion des parties terminales des membranes fermera l'autophagosome contenant des agrégats de protéines ubiquitinées ou des organites endommagés.

Lorsque l'autophagosome est formé, le complexe Atg12-Atg5 quitte celui-ci, le pool de LC3 associé à la surface cytosolique de la membrane de l'autophagosome est clivé du PE par l'Atg4 et recyclé. Ensuite, le complexe ULK1/2 se dissocie de la membrane, induisant la fermeture de l'omégasome et le bourgeonnement de l'autophagosome enrichi en LC3 [20].

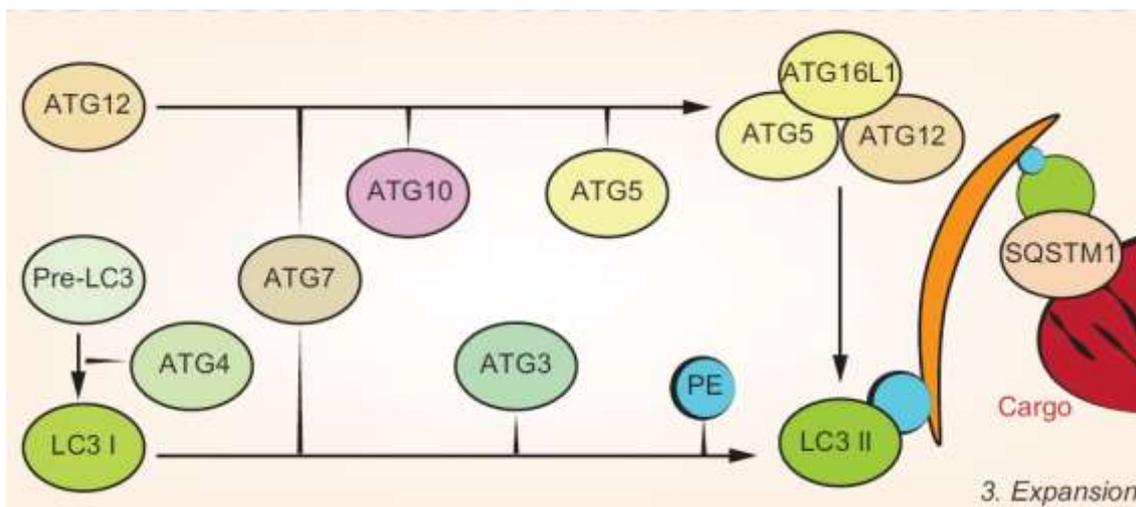


Figure 4.4- Etapes d'élongation du phagophore par les complexes de conjugaison [8].

#### 4.4.3. Fusion de l'autophagosome mature avec le lysosome

La maturation des autophagosomes formés dans le cytoplasme en réponse à une carence en nutriments active leur liaison aux microtubules et leur transfert en zone périnucléaire où se concentrent les lysosomes pour favoriser leur fusion.

Lors de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, la membrane autophagosomale externe fusionne avec la membrane lysosomale unique. Ensuite, la membrane autophagosomale interne est dégradée par les hydrolases lysosomales, ce qui expose le matériel cytoplasmique à la dégradation (**Figure 4.5**). Un ensemble de facteurs sont impliqués dans cette étape dont les complexes SNARE, les composants du cytosquelette, les protéines motrices associées et les phospholipides.

Le processus de fusion des autophagosomes avec les lysosomes fait intervenir les récepteurs lysosomiaux Lamp 1 et 2 et Rab7 [21].

En fin de processus, l'autophagosome est libéré et l'omégasome est redissout dans le RE.

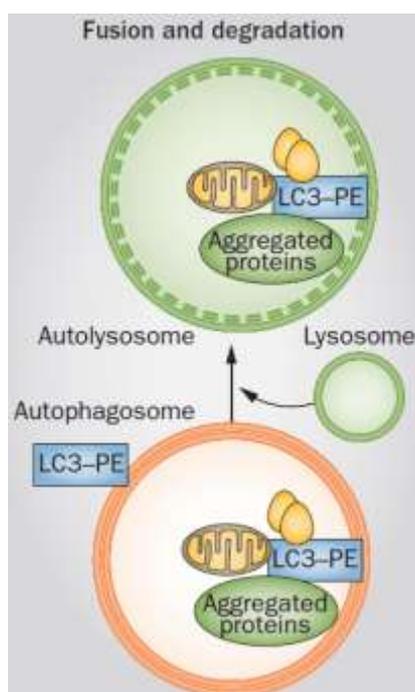


Figure 4.5 – La phase de fusion et de dégradation [20].

#### 4.4.4. Rôle des protéines LC3 et p62

##### 4.4.4.1. La protéine LC3

La protéine LC3 est une protéine ubiquitinée associée aux microtubules. Trois isoformes de LC3 existent chez les mammifères : LC3A, LC3B et LC3C. La protéine LC3B est initialement synthétisée sous la forme de proLC3B. Dès sa synthèse, proLC3B est protéolysée par Atg4 pour former LC3B-I présent dans le cytosol. Le poids moléculaire de LC3B-I est de 14kDa. L'exposition d'une glycine à l'extrémité carboxy-terminale de LC3B-I, la conjugaison à l'Atg7, l'Atg3, le complexe Atg12-5-16L1 et à la phosphatidyléthanolamine (PE) hautement lipophile génère le LC3B-II recruté sur la membrane des autophagosomes [22]. La protéine LC3B-II est un marqueur cellulaire des autophagosomes et sa détection permet une mesure de l'autophagie [23,24].

La liaison de LC3B-II à des protéines cargos SQSTM1/p62 permet la fixation des protéines ubiquitinées à la membrane du phagophore et favorise également la fixation et la fusion des membranes des endosomes ou des mitochondries avec les autophagosomes. Actuellement, la protéine LC3B-II est la seule protéine spécifiquement localisée aux structures autophagiques du phagophore conduisant à la dégradation lysosomale [25] (Figure 4.4).

Des anticorps spécifiques dirigés contre LC3B-I et LC3B-II sont largement utilisés en western blot pour mesurer l'autophagie. La détection de LC3B-I et LC3B-II peut se faire simultanément car le LC3B-II, malgré son poids moléculaire plus important que LC3B-I, migre plus rapidement du fait de sa plus grande hydrophobicité liée à son association à la PE [24].

##### 4.4.4.2. La protéine p62

La protéine p62 est une protéine cargo (SQSTM1/p62), récepteur d'autophagie, qui se lie aux protéines ubiquitinées et les fixe à la membrane du phagophore avec le LC3B-II. Une fois fusionnée avec le lysosome, la protéine p62 est dégradée. La protéine p62, bien que peu spécifique, peut être mesurée comme marqueur complémentaire de l'activité autophagique [26].

La protéine p62 est constituée de plusieurs domaines (Figure 4.6):

- Domaine PB1 : domaine d'homo- et d'hétéro-oligomérisation avec d'autres protéines comportant un domaine PB1.
- Domaine LIR(LC3-interaction) /LRS(LC3-reconnaissance) : domaine permettant l'interaction avec LC3.
- Domaine KIR : domaine d'interaction avec la protéine Keap1.
- Domaine ZZ : doigt de zinc de type ZZ.
- Domaine de fixation de TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6)
- Domaine UBA : domaine d'interaction avec des protéines ubiquitinées.

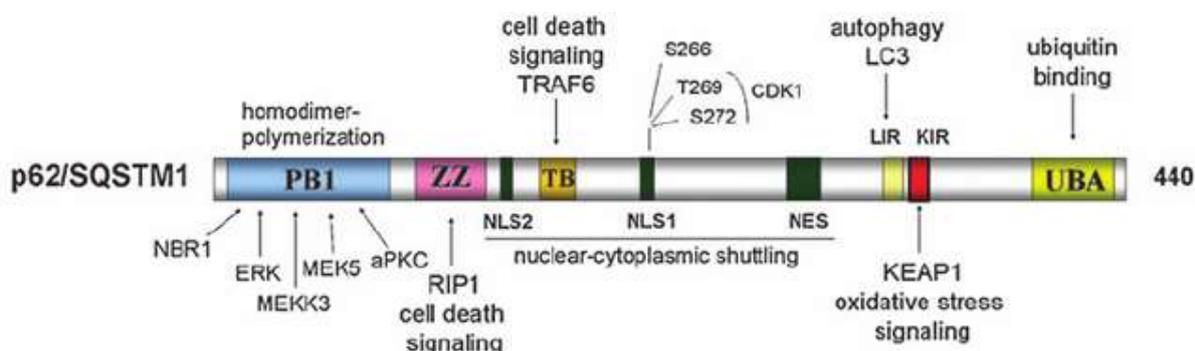
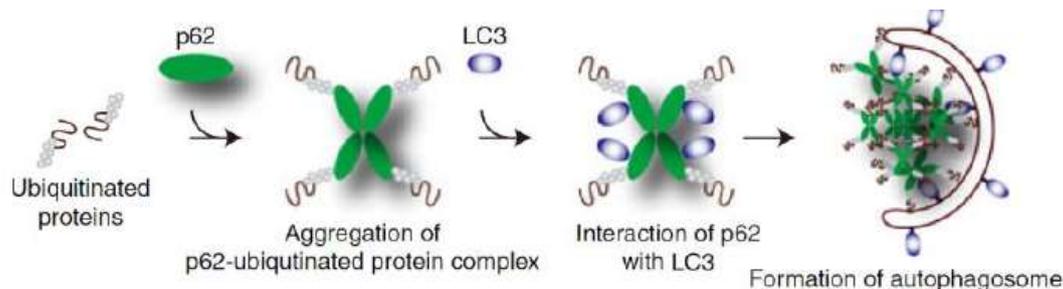


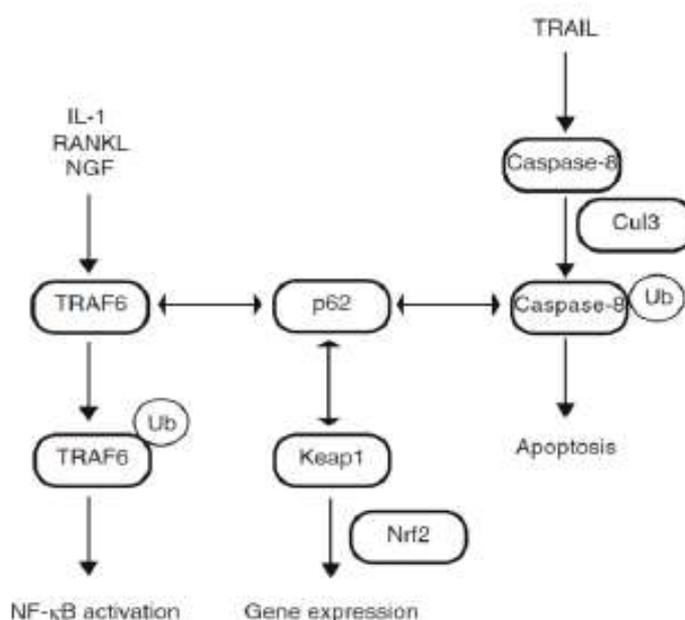
Figure 4.6– La protéine p62/SQSTM1 et ses différents domaines d'interaction [27].



**Figure 4.7– Mécanisme de séquestration des protéines ubiquitinées [28].**

Inactive, la protéine p62 est sous forme homodimérique empêchant sa liaison à des protéines ubiquitinées. Sa phosphorylation par le complexe ULK1 induit sa transition en monomère et active sa capacité à lier des protéines ubiquitinées (**Figure 4.7**). Une multitude de modifications post-traductionnelles régulent l'activité de p62 en conditionnant sa capacité d'interagir avec différents partenaires. En particulier, p62 intervient dans le contrôle de l'apoptose/survie cellulaire et la réponse au stress via différents mécanismes:

- Activation de NF- $\kappa$ B *via* IL-1 (interleukine 1), RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B), NGF (nerve growth factor) sur le domaine TRAF6. La protéine TRAF6 est alors ubiquitinée et active la voie NF- $\kappa$ B.
- Action sur l'expression des gènes via le domaine KIR qui fixe la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1).
- Modulation de l'apoptose par action sur l'ubiquitination de la caspase 8. (Voie de TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)) (**Figure 4.8**).



**Figure 4.8– Autres voies de signalisation régulées par la protéine p62 [12].**

#### 4.4.5. La détection de l'autophagie

Différents tests permettent de mettre en évidence le phénomène d'autophagie *in vitro* et *in vivo*. La détection de LC3B-II par western blot ou par fluorescence associée à la mise en évidence d'autophagosomes par microscopie électronique représentent les méthodes de détection les plus utilisées [28].

Ils représentent cependant, une « image » à un temps précis de la situation cellulaire mais ne donnent pas d'information sur l'ensemble du processus. L'autophagie étant un processus dynamique à plusieurs étapes, l'accumulation d'autophagosomes (en microscopie électronique), une coloration punctiforme verte en immunofluorescence ou un changement dans la lipidation du LC3 peuvent représenter une réduction du turnover autophagosomale ou une augmentation de la formation des autophagosomes [29].

En western blot, les niveaux globaux de LC3B-II sont normalisés à la  $\beta$ -actine afin d'établir une évaluation pondérée la plus correcte du niveau d'autophagie [30].

La mesure du *flux autophagique* (la quantité de matériel cytoplasmique à l'intérieur des lysosomes dégradée par unité de temps) est de plus en plus utilisée. L'augmentation du LC3B-II peut avoir des significations différentes : soit une

augmentation de la synthèse d'autophagosomes, soit une diminution du turnover des autophagosomes par défaut de la fusion avec les lysosomes ou par diminution de l'activité protéolytique lysosomale.

L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité lysosomale est de plus en plus recommandée pour analyser le flux autophagique. L'hydroxychloroquine (inhibiteur de l'autophagie) inhibe la dégradation du contenu des autophagolysosomes par inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  au niveau des lysosomes, ce qui a pour effet d'inhiber les protéases lysosomales par augmentation du pH intralysosomal. Cela nécessite cependant une double expérimentation. La comparaison des expérimentations avec et sans inhibiteur des lysosomes permet, si la différence est élevée de conclure à une augmentation du flux autophagique [22].

#### **4.4.6. Hormones et voies de signalisation de l'autophagie**

##### **4.4.6.1. Hormones**

L'insuline, les acides aminés et le glucose inhibent l'autophagie.

L'insuline et les facteurs de croissance inhibent l'autophagie *via* l'activation de mTORC1 par Rheb, mais également *via* une voie indépendante de mTORC1 en entraînant une régulation négative de la transcription des protéines Atg.

Le glucagon et la protéine kinase activée AMP (AMPK activée) quant à elles, stimulent l'autophagie [31].

##### **4.4.6.2. Voies de signalisation**

###### **4.4.6.2.1. Voie insuline/PI3K/AKT**

L'insuline se fixe sur son récepteur (IR) et active la protéine adaptatrice IRS1 (insulin receptor substrate 1). IRS1 active alors la phosphoinositide 3-kinase de classe 1 qui génère le PtdIns (3,4) P2 et le PtdIns (3,4,5) P3 au niveau de la membrane plasmique. Les PtdIns P2 et P3 activent la protéine kinase 1 dépendante du phosphoinositide (PKD1) et la protéine kinase B (PKB/Akt). La PKB phosphoryle et inhibe le complexe protéique TSC1-TSC2 et son activité GTPase envers Rheb-GTP. Il y a donc stabilisation de Rheb-GTP, stimulation de mTOR et inhibition de l'autophagie. PTEN, une 3'-phosphoinositide phosphatase, antagonise PKB et stimule l'autophagie.

mTOR et PKD1 stimulent la p70S6 kinase qui active l'autophagie. La kinase phosphorylant la sous-unité ribosomale S6 (p70S6K) peut phosphoryler IRS1, ce qui régule négativement le signal de l'insuline et entraîne une baisse du PtdIns(3,4,5)P3, un inhibiteur de l'autophagie. Ce feedback négatif de mTOR assure même en conditions nutritionnelles correctes, le maintien d'un niveau autophagique de base. Durant le jeûne, l'inhibition de mTOR bloque l'activation de S6K, ce qui empêche un emballement de l'autophagie dans ces conditions.

La protéine mTOR (protéine cible de la rapamycine) existe sous forme de 2 complexes distincts : mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est formé par 5 composants : mTOR, Raptor (protéine régulatrice associée à mTOR), mLST8, PRAS40, DEPTOR et intègre des stimuli tels que le status nutritionnel, les facteurs de croissance, le stress cellulaire, et est sensible à la rapamycine.

Le complexe mTORC2 est composé de mTOR (Rictor), mLST8, DEPTOR, mSin1, Protor1/2 et est insensible au stimulus nutritionnel et à la rapamycine mais sensible aux facteurs de croissance. Il n'est pas directement impliqué dans la régulation de l'autophagie mais peut inhiber le complexe TSC via l'activation d'AKT et activer secondairement mTORC1 [32].

Le complexe mTORC1 est un des principaux senseurs du métabolisme cellulaire qui régule la phosphorylation d'Atg13 [33]. En cas de privation de nutriments, mTORC1 est inhibé et entraîne une activation de l'autophagie par déphosphorylation d'Atg13 ce qui augmente son affinité pour le complexe ULK1/2 [10]. La surexpression d'ULK 1/2, par feedback négatif, inhibe mTOR.

#### 4.4.6.2.2. Voie de l'AMPK

L'AMPK est la contrepartie de mTOR. L'AMPK est une sérine-thréonine kinase majeure du sensing énergétique qui active une grande variété de processus cataboliques et inhibe simultanément les voies anaboliques. Il s'agit d'un complexe protéique hétérotrimérique dont l'activation nécessite la phosphorylation d'un résidu thréonine (T172) de la sous-unité catalytique  $\alpha$ . A la fois l'ATP et l'AMP régulent de manière opposée l'AMPK. L'AMP se fixe sur la sous-unité  $\gamma$ , et active la phosphorylation de l'AMPK. Il est également démontré que l'ADP peut se lier à l'AMPK et stimuler son activation. Durant le jeûne, l'accumulation d'AMP, la baisse de l'ATP et des acides aminés entraînent l'inhibition de mTOR par une voie indépendante de l'insuline : l'activation de la voie de LKB1-AMPK. L'AMPK phosphorylée stimule l'autophagie par activation indirecte de TSC1/TSC2 inhibant mTORC1 et par l'activation directe de ULK1/2 (**Figure 4.9**). L'AMPK phosphoryle également l'inhibiteur p27 de la kinase cycline-dépendante et active l'autophagie.

La diminution en acides aminés augmente le calcium cytosolique libre, favorise la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline activé : CaMKKB qui stimule également l'AMPK [34].

L'AMPK régule également l'autophagie en phosphorylant p53 et p27. La phosphorylation de p53 cytosolique permet sa translocation nucléaire et l'activation de gènes qui stimulent l'AMPK et l'autophagie. La phosphorylation de p27, via l'inhibition de RHOA, induit l'autophagie par levée de l'interaction des calpaines avec Bécline1 [35].

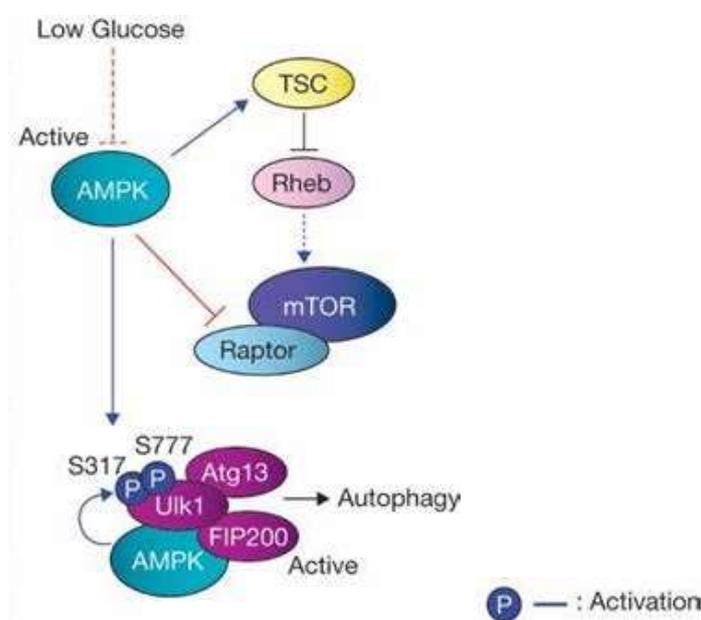


Figure 4.9– Schéma représentant la voie d'activation de l'autophagie par l'AMPK [36].

#### 4.4.6.2.3. Le complexe phosphatidylinositol 3 Kinase (PtdIns3K) de classe I et III

Chez les mammifères, il existe 2 familles de PtdIns3K en relation directe avec le contrôle de l'autophagie : les PtdIns3K de classe I et classe III. La PtdIns3K de classe III (hVps34) génère des PtdIns (3)P qui stimulent l'autophagie, en formant un complexe avec p150 et Bécline 1.

La PtdIns3K de classe I, en réponse au stimulus des facteurs de croissance, utilise les PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> comme substrat pour produire des PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>, et régule négativement l'autophagie via le complexe Akt-mTORC1-ULK1. (**Figure 4.10**).

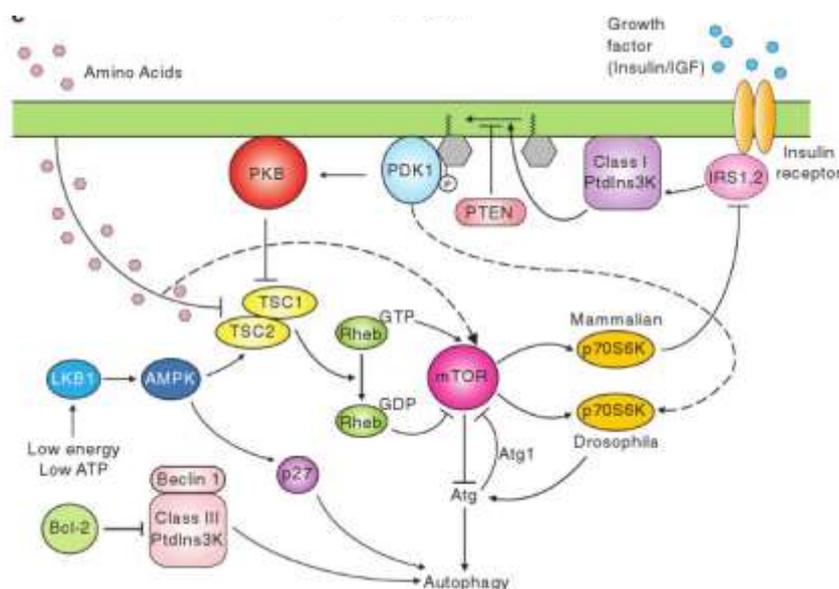


Figure 4.10– Régulation de l'autophagie par les PtdIns3K chez les mammifères [10].

#### 4.4.6.2.4. Voie Ras/PKA (AMP-dependent protein kinase A)

Chez les mammifères, Ras joue un rôle de régulateur négatif de l'autophagie par l'intermédiaire de la voie de signalisation PI3K. L'activation de Ras atténue la dégradation des protéines secondaire à un déficit énergétique en agissant par la voie mTOR et en modulant la suppression de la dégradation des protéines induite par le facteur de croissance [37].

Les sous-unités de PKA régulatrices (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) et catalytiques (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ ) se dissocient grâce à 2 molécules d'AMPc. RI $\alpha$  peut interagir avec mTOR soit en affectant son activité kinase soit en séquestrant une phosphatase dans le complexe RI $\alpha$ , mTOR, phosphatase qui contrôle la phosphorylation de mTOR [38].

#### 4.4.6.2.5. Voie du stress oxydant : MAPK/ERK/JNK

Le stress oxydant correspond à une dysrégulation de la balance redox avec surproduction de radicaux libres ROS qui peuvent inhiber mTORC1 par activation de TSC et de l'AMPK. Les lésions de l'ADN peuvent également activer p53 causant l'activation de TSC2, PTEN et l'AMPK $\beta$ 1 et supprimer également l'activation de mTORC1 [39].

L'activation de l'autophagie par la production de radicaux libres fait intervenir plusieurs protéines telles que l'AMPK, p38MAPK, JNK, ERK. Deux mécanismes interviennent : d'une part, l'activation de p38 permet la phosphorylation de Bcl2 qui rompt le complexe Bcl2-Bécline 1 et promeut l'autophagie et d'autre part, la translocation nucléaire de p53 et l'activation de gènes autophagiques (Figure 4.11).

JNK peut également phosphoryler Bcl2 et empêcher la formation du complexe Bcl2-Bécline1. Bécline 1 est alors disponible pour l'induction de l'autophagie. De plus, une fois activée, JNK peut phosphoryler et activer c-jun et c-Fos et permettre une augmentation de la transcription de Bécline 1 et des gènes ATG [40].

La famille des MAPK (mitogen-activated protein kinases) incluant ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK 1/2/3 (c-Jun-NH2-terminal kinases) et p38 MAP kinase peut stimuler l'autophagie par une voie indépendante de Bécline 1. L'activation de GTP-Ras recrute une kinase Raf. Celle-ci activée phosphoryle 2 résidus sérine de MEK1/2 (mitogen protein kinase 1 et 2) qui à son tour stimule l'autophagie [41].

Il semblerait que Ras puisse par des voies différentes, mTOR versus MAPK, stimuler ou inhiber l'autophagie [37].

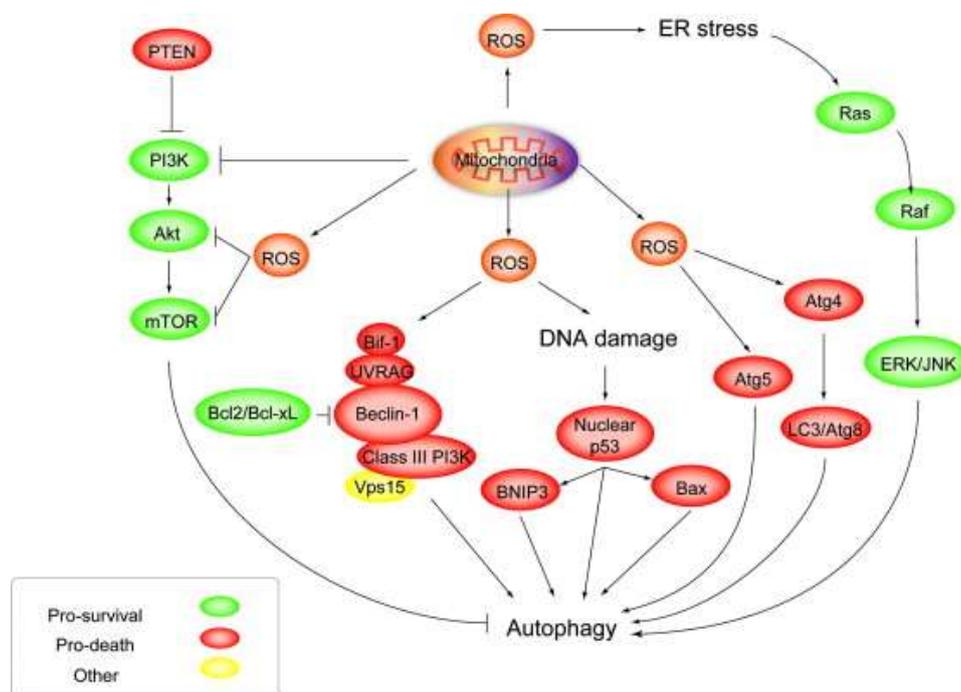


Figure 4.11- Représentation des voies d'activation de l'autophagie par les ROS [42].

#### 4.4.6.2.6. Autres voies de régulation de l'autophagie

- **NF- $\kappa$ B** : stimulerait l'autophagie par activation de Bécline1.
- **E2F1** (E2F transcription factor) : stimulerait l'autophagie par activation de l'expression de gènes autophagiques.
- **HIF-1** (hypoxia-inducible factor-1) : stimulerait l'autophagie secondairement à l'hypoxie par induction de l'expression des protéines BNIP3 et BNIP3L qui rompent l'interaction BCL-2 et Bécline1 et augmente l'expression de Bécline 1 et Atg5.
- **Foxo** : stimulerait l'autophagie par induction de l'expression de gènes autophagiques.
- **p53** : inhiberait l'autophagie en modifiant l'action de gènes modulateurs de l'autophagique.
- **PERK/eIF2 $\alpha$**  : stimulerait l'autophagie par l'activation de l'expression d'ATG [18].

#### 4.4.6.2.7. Rôle des nucléotides : ADP

Lors d'un stress cellulaire tel qu'un déficit énergétique ou une lésion cellulaire, il y a libération dans le milieu extracellulaire, de nucléotides à partir des cellules hépatiques. L'augmentation du taux d'ADP extracellulaire peut dès lors jouer un rôle dans la propagation de l'autophagie en agissant via un récepteur purinergique couplé à la protéine G: le récepteur P2Y13. L'activation du récepteur P2Y13 par l'ADP stimule l'autophagie [43].

La stimulation de l'autophagie par l'ADP peut se faire à la fois par la stimulation de la voie MAPK et secondairement l'activation de la phosphorylation de ERK1/2 et, par inhibition de la phosphorylation du récepteur à l'insuline (I $\beta$ ), de la protéine kinase B et de la voie Akt. L'ADP, puissant agoniste du récepteur P2Y13, stimule l'autophagie à la fois par inhibition d'Akt et stimulation de la voie MAPK (ERK1/2) [44] (Figure 4.12).

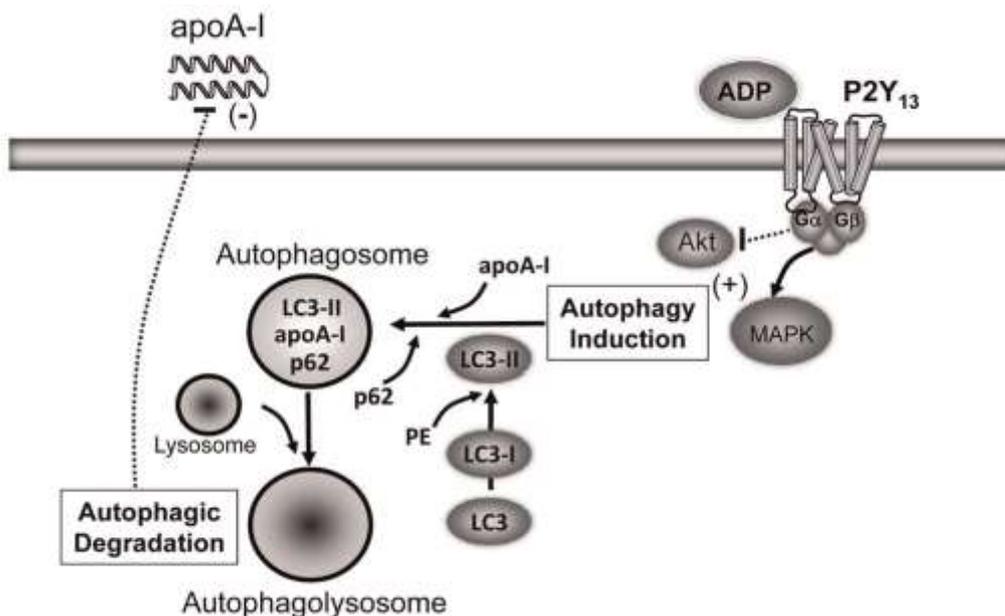


Figure 4.12– Mode d'action de l'ADP sur l'autophagie [44].

#### 4.4.6.2.8. Rôle de l'HMGB1

L'HMGB1 (high mobility group box 1) est une protéine nucléaire associée à la chromatine normalement localisée dans le noyau agissant comme une protéine chaperonne de l'ADN impliquée dans la régulation d'un certain nombre de processus tels que la réplication, la transcription. En plus de sa fonction nucléaire, l'HMGB1 peut être transloquée dans le cytoplasme et être libérée dans le milieu extracellulaire dans des conditions de stress cellulaire. L'HMGB1 joue un rôle de régulateur essentiel dans l'autophagie. Dans des conditions de stress nutritionnel, l'HMGB1 migre du noyau vers le cytoplasme et entraîne la dissociation de Bécline 1 et Bcl-2 en se liant directement avec Bécline 1 et induit l'autophagie. L'HMGB1 peut également induire l'autophagie par phosphorylation de la voie ERK1/ 2 (**Figure 4.13**). L'HMGB1 peut être libérée dans le milieu extracellulaire passivement lors de la mort cellulaire ou activement par stimulation des cytokines. Elle joue alors un rôle de molécule DAMP (damage-associated molecular pattern) qui active les cellules immunitaires. De manière intéressante, il a été montré qu'un taux d'HMGB1 circulant réduit par un jeûne court est associé à une augmentation de l'autophagie au niveau du foie [45].

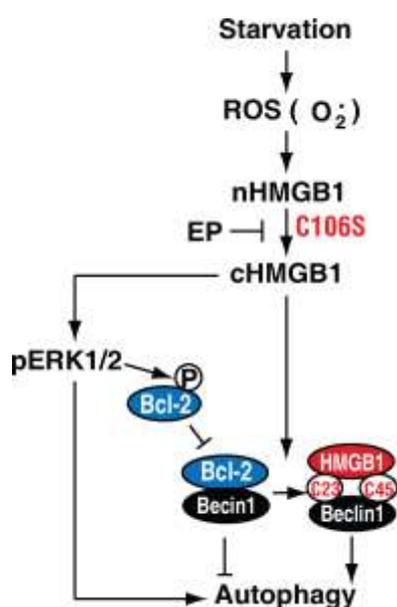


Figure 4.13– Voies d'activation de l'autophagie par l'HMGB1 cytosolique [46].

EP : ethyl pyruvate (inhibiteur de la translocation) ; C106S : mutation cystéine position 106 ; nHMGB1 : HMGB1 nucléaire ; cHMGB1 : HMGB1 cytosolique ; C23 et C45 : pont disulfure intramolécule

L'inflammasome induit l'activation de la caspase 1, ce qui a pour conséquence une downrégulation de l'inhibiteur de la calpaine : la calpastatine libérant la calpaine (**Figure 4.14A**). A son tour, celle-ci peut, en l'absence d'HMGB1, se lier à Bécline 1 et Atg5 et empêcher l'initiation de l'autophagie en favorisant leur clivage et le déclenchement de l'apoptose (**Figure 4.14C**). L'HMGB1 cytosolique empêche le clivage de Bécline 1 et Atg5 médié par la calpaine durant l'inflammation (**Figure 4.14B**) [47,48].

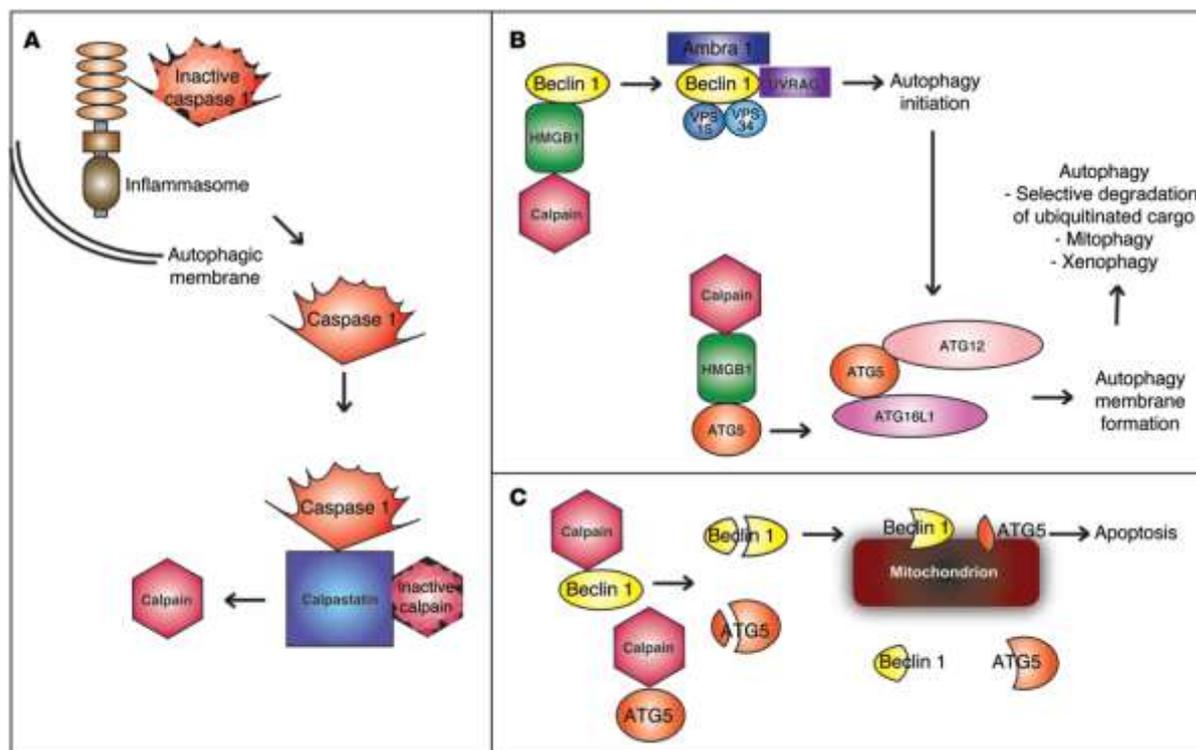


Figure 4.14– Voies d'activation de l'autophagie par l'HMGB1 cytosolique [48].

#### 4.4.7. Interaction entre apoptose et autophagie

Il existe des régulateurs communs entre l'apoptose et l'autophagie. C'est le cas des protéines Bcl-2/Bcl-XL qui sont des molécules anti-apoptotiques possédant 3 domaines BH différents. Les domaines BH se regroupent pour former une poche hydrophobe capable d'interagir avec les domaines BH des molécules pro-apoptotiques de la famille « Bax-like ». Ces interactions reposant sur une reconnaissance par homo-domaines peuvent précipiter un certain nombre de scénari.

Par exemple, l'interaction de ces molécules avec des molécules pro-apoptotiques telles que Bax au niveau de la mitochondrie entraîne une inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose. Bcl-2/Bcl-XL peuvent également interagir avec le domaine BH3 de la Beclin-1 et inhiber l'autophagie (**Figure 4.15**).

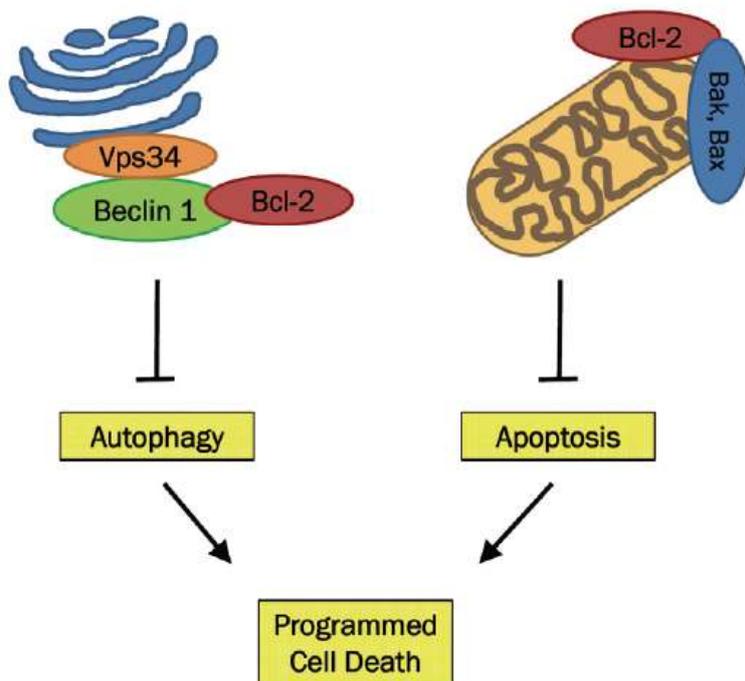


Figure 4.15– Interaction apoptose et autophagie : rôle de Bcl-2 [49].

Les signaux pro-apoptotiques déclenchent, au niveau cellulaire, l'activation des protéines pro-apoptotiques à domaines BH3 telles que Bad. Bad déplace Bax de Bcl-2 permettant à Bax de se localiser au niveau de la membrane mitochondriale, d'ouvrir les pores mitochondriaux libérant le cytochrome C dans le cytosol et d'activer les caspases intra-cellulaires effectrices de la mort cellulaire par apoptose : les caspases 9 et 3. Bax inhibe l'autophagie en induisant le clivage de Bécline 1 par la caspase 3.

Bécline 1, molécule de la famille BH3 seul, est également pro-apoptotique. Elle est capable d'interagir avec Bcl-2 grâce à un domaine BBD (Bcl-2 Binding Domain) possédant une affinité très forte. La liaison de Bcl-2 à Bécline 1 permet l'inhibition de l'autophagie. JNK-1 (c-jun N-terminal kinase 1) peut phosphoryler Bcl-2 et permettre sa dissociation de Bécline1 et l'activation de l'autophagie. Réciproquement, Bécline1 peut être déphosphorylé par DAPK (death-associated protéine kinase) et augmenter son affinité pour Bcl-2 ce qui inactive l'autophagie (Figure 4.16).

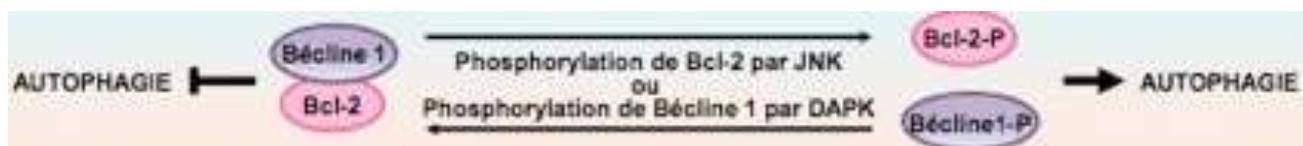


Figure 4.16– Interactions apoptose et autophagie : rôle des phosphorylations dans l'interaction Bécline 1/Bcl-2 [12].

Bad peut également induire l'autophagie en libérant Bécline 1 de son interaction avec Bcl-2 par compétition (Figure 4.17).

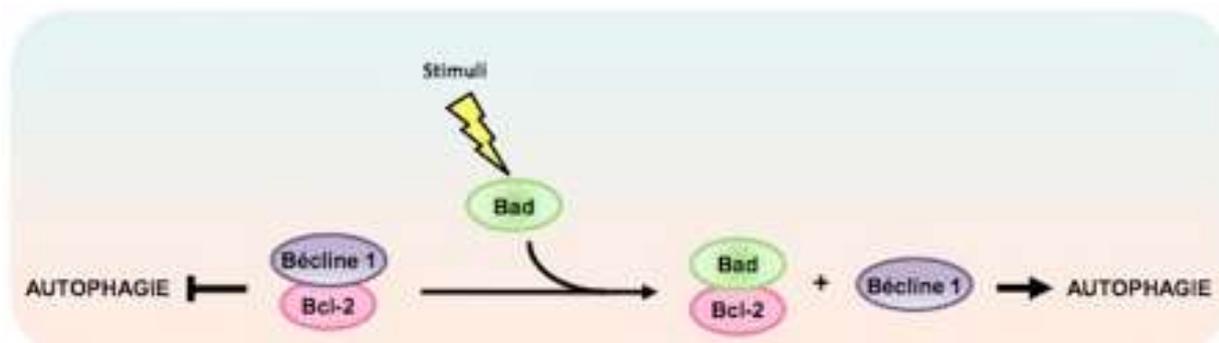


Figure 4.17– Interactions apoptose et autophagie : rôle de Bad dans l’interaction Bécline 1/Bcl-2 [12].

Enfin, Atg5 peut également intervenir dans la cascade apoptotique. Elle peut être clivée par les calpains, ce qui induit sa translocation au niveau de la mitochondrie et permet son interaction avec Bcl-XL ce qui lève l’inhibition de Bax.

L’Atg5 a donc 2 rôles : l’induction de l’autophagie et, suite à son clivage induit par un stimulus pro-apoptotique, sa participation à l’apoptose *via* sa liaison à Bcl-XL. Cette liaison empêche Bcl-XL de séquestrer Bax qui alors libéré peut rejoindre la mitochondrie et induire le largage du cytochrome c dans le cytosol (Figure 4.18).

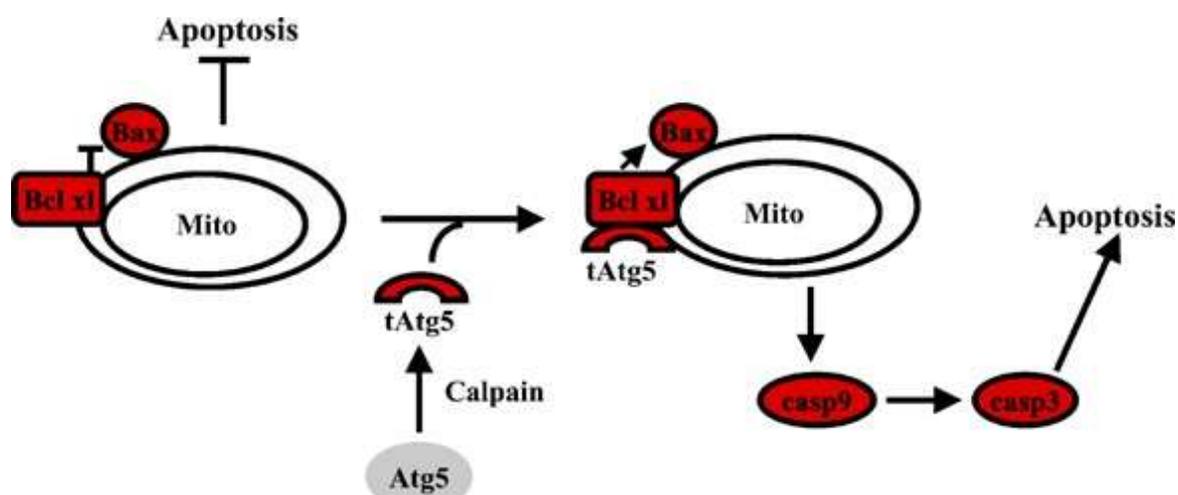


Figure 4.18– Interactions apoptose et autophagie : rôle d’Atg5 [50].

#### 4.4.8. Les modulateurs pharmacologiques de l’autophagie

Les modulateurs pharmacologiques de l’autophagie représentent des outils expérimentaux permettant d’étudier le rôle des étapes ciblées au sein même du processus global d’autophagie et le rôle même de l’autophagie dans les diverses conditions physiopathologiques. Ces agents pharmacologiques peuvent aussi servir de médicaments ou de modèles moléculaires pour l’élaboration de nouveaux principes actifs dans le traitement des pathologies humaines. Le choix entre inhibiteur ou stimulateur de l’autophagie, dépendra du bénéfice attendu de la modulation choisie du processus autophagique dans la pathologie ciblée. Les sites cellulaires et cibles d’action de ces modulateurs de l’autophagie sont repris dans le tableau 3 et leurs modes d’actions illustrés dans la figure 4.19.

	<b>Activateurs de l'autophagie</b>	<b>Inhibiteurs de l'autophagie</b>
<b>Action au niveau du complexe Vps34-Bécline1</b>		
Inhibiteurs de la PI3Kinase III		3-méthyladénine Wortmannine
Inhibiteurs IMPase	Chlorure de lithium ( $\downarrow$ IP3)	
Blocage interaction Bécline 1,2, molécules à domaine BH	ABT737	
Inhibiteurs de la voie de sécrétion	Bréfeldine A Thapsigargine Tunicamycine	
$\downarrow$ inositol intracellulaire	Carbamazépine Acide Valproïque	
Inhibiteurs de peptidases : USP10 et 13		Spautine 1
<b>Inhibiteur de mTOR</b>	Rapamycine (sirolimus) Temsirolimus Everolimus	
<b>Action sur le calcium intracellulaire</b>	Penitrem A (inh canaux $Ca^{2+}$ ) Calpastatine (inh calpaïne)	
<b>Inhibiteur de l'activité lysosomale</b>		BafilomycineA1 (inh pompe Na/K)  Chloroquine Hydrochloroquine NH <sub>4</sub> Cl PepsistatinA E64d

**Tableau 4.1- Modulateurs pharmacologiques de l'autophagie.**

La prudence doit être de mise pour l'interprétation des effets liés à l'utilisation de ces inhibiteurs car Bécline1 et Atg5 ne sont pas les seules voies possibles d'activation de l'autophagie [2].

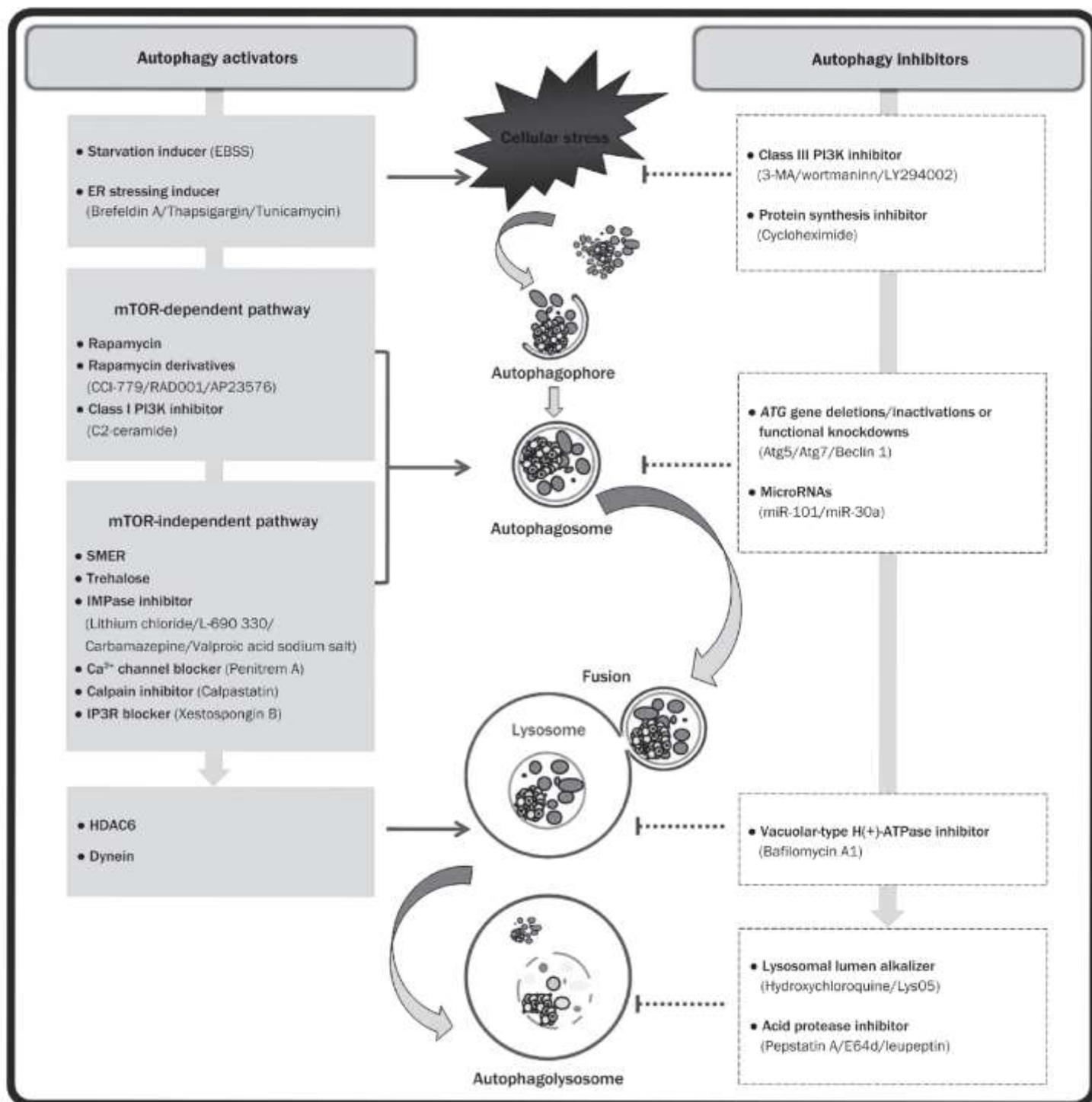


Figure 4.19– Activateurs et inhibiteurs de l'autophagie [2].

#### **4.4.9. Activité physiologique ou protectrice de l'autophagie**

L'autophagie intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que le maintien de l'homéostasie en dégradant les protéines et organites déficients au sein des cellules, durant le développement et l'embryogenèse, durant des phénomènes de stress cellulaire : déprivation en nutriments ou en facteurs de croissance et invasion cellulaire par des agents pathogènes ainsi que dans le cadre de maladies neurodégénératives.

Durant les périodes de jeûne, l'autophagie stimule la gluconéogenèse, la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la synthèse des corps cétoniques. Les acides aminés nécessaires à la gluconéogenèse sont produits par la protéolyse autophagique. La lipophagie des gouttelettes lipidiques fournit les acides gras des triglycérides et contrôle le niveau des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) [51,52].

Des souris KO pour l'Atg7 accumulent des gouttelettes lipidiques, augmentent la concentration hépatique de triglycérides et de cholestérol entraînant une hépatomégalie. Dans des modèles de souris obèses avec insulino résistance, il est démontré qu'il existe un défaut d'autophagie hépatique [53].

La réduction d'ATP par la restriction alimentaire ou d'autre stress cellulaire tel que la dysfonction mitochondriale stimule une réponse métabolique via l'AMPK pour générer de l'énergie: augmentation de la captation de glucose, glycolyse et catabolisme lipidique [54].

De nombreuses études ont mis en évidence que le dysfonctionnement de l'autophagie des cellules  $\beta$  est corrélé au développement de l'obésité et du diabète.

Chez le nouveau-né à jeun, l'autophagie hépatique permet le maintien des concentrations plasmatiques de glucose [55].

L'autophagie permet une survie cellulaire en dégradant du matériel cytoplasmique qui libère acides aminés et acides gras. Ceux-ci peuvent alors être utilisés par les mitochondries pour produire de l'ATP et les acides aminés nécessaires à la synthèse protéique pour maintenir la cellule en vie. L'invalidation de gènes autophagiques tels que Atg5 et Atg7 chez la souris, entraîne une accumulation de protéines et organites anormaux au sein des cellules avec développement d'hépatomégalie et d'insuffisance hépatique [56].

#### **4.4.10. Autophagie et physiologie du foie (Figure 4.20)**

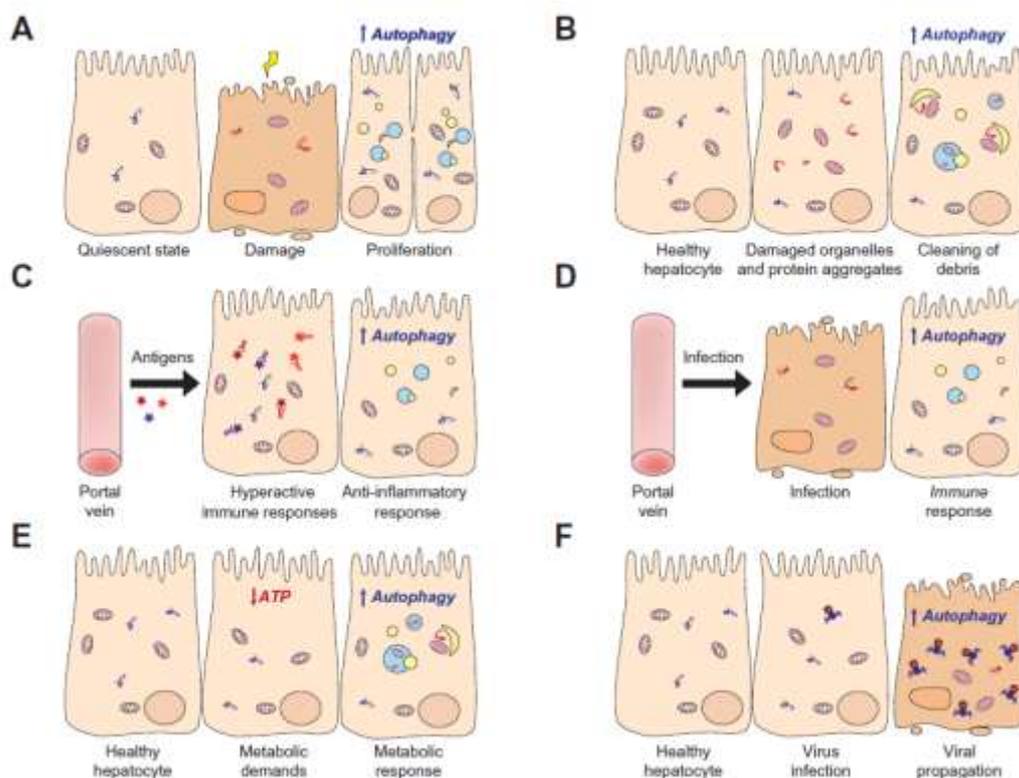
L'autophagie opère un contrôle de qualité pour le maintien de l'homéostasie hépatique à la fois au niveau des cellules hépatiques et des cellules non parenchymateuses mais joue également un rôle dans la régulation de nombreuses fonctions hépatiques. Les hépatocytes ont un turnover limité. Leur demi-vie est estimée à 6-12 mois et peuvent donc accumuler une série de déchets cellulaires en l'absence d'autophagie. Cependant, lors de stress cellulaire, les hépatocytes peuvent rapidement proliférer et, en cas de déficit autophagique, entraîner l'apparition de cellules néoplasiques [8].

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme glucidique et lipidique de manière intimement connectée à l'autophagie. Il est également en contact avec un certain nombre de xénobiotiques, de médiateurs de l'inflammation, de virus et l'autophagie joue un rôle essentiel de cytoprotection.

Le flux autophagique de base du foie est relativement plus élevé que celui d'autres organes tels que le cerveau et fluctue entre les périodes de jeûne-alimentation étant stimulé en cas de jeûne prolongé [57,58].

Il existe une autophagie hépatique de base dont la suppression entraîne hépatomégalie, inflammation, hépatite et tumorigenèse. L'inhibition de l'autophagie est responsable d'une accumulation de SQSTM1, qui active secondairement la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, une inhibition des gènes codant pour les protéines antioxydantes et une inhibition des enzymes de détoxification (activation du facteur de transcription Nrf2) [59].

Dans ce cadre, l'autophagie joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de nombreuses maladies hépatiques telles que le déficit en  $\alpha$ -1 antitrypsine, la stéatose hépatique alcoolique et non alcoolique, le développement de l'hépatocarcinome [60].



**Figure 4.20- Fonctions de l'autophagie dans le foie. A : rôle dans le maintien de l'homéostasie. B : rôle dans l'élimination de produits du métabolisme cellulaire normal. C : rôle de limitation de l'inflammation induite par des antigènes et toxiques venant du réseau porte. D : rôle de support immunitaire contre l'invasion de virus. E : rôle dans le maintien du métabolisme cellulaire. F : rôle dans l'invasion virale par détournement de l'autophagie. [8]**

#### **4.4.11. Autophagie et pathologies du foie (Figure 4.20)**

##### **4.4.11.1. Autophagie et pathologies d'accumulation**

L' $\alpha$ -1 antitrypsine est une glycoprotéine possédant une activité élastase inhibitrice. Cette glycoprotéine est principalement synthétisée par les hépatocytes. Cependant, elle possède un polymorphisme génétique et certaines mutations peuvent entraîner le développement d'une pathologie marquée par l'aggrégation de la glycoprotéine dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et le développement d'hépatite, de cirrhose, d'hépatocarcinome et d'insuffisance hépatique. L'autophagie est stimulée par l'accumulation intracytoplasmique de ces agrégats de protéines déficientes et pourrait réduire l'extension de la maladie [61].

La maladie de Wilson est une pathologie héréditaire du métabolisme du cuivre qui se marque par une accumulation de cuivre dans le foie, les reins et les yeux. Dans cette pathologie, il y a une uprégulation de l'autophagie afin de prévenir la mort cellulaire par accumulation de cuivre dans les cellules [62].

La glycogénose de type 1A est une pathologie héréditaire d'anomalie du stockage du glycogène lié à un défaut de la glucose-6-phosphatase qui convertit le glucose-6-phosphate en glucose. Il y a donc anomalie du métabolisme intracellulaire du glucose et accumulation de glycogène dans les hépatocytes avec développement d'hépatomégalie et de risque de dégénérescence néoplasique du foie. Dans cette pathologie, il existe une anomalie dans la signalisation par mTORC1, AMPK, Sirtuine 1 compromettant l'activité de TFEB et entraînant une baisse de la machinerie d'autophagie [63].

##### **4.4.11.2. Autophagie et stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD)**

La stéatose hépatique non alcoolique est la manifestation hépatique du syndrome métabolique comprenant l'obésité, l'insulino-résistance, le diabète de type 2, la dyslipidémie et l'hypertension. Dans les hépatocytes gras, l'autophagie est diminuée. La stéatose hépatique peut être ralentie par stimulation de l'autophagie [64].

La stéatose hépatique non alcoolique est caractérisée par l'accumulation de lipides dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et la présence de mégamitochondries par défaut de mitophagie. Le foie est le 2<sup>ème</sup> organe de stockage des lipides après le tissu adipeux. L'autophagie est corrélée de manière forte avec la physiopathologie de la NAFLD. L'autophagie peut, dans les phases débutantes de la maladie, éliminer les gouttelettes lipidiques accumulées et un dysfonctionnement de l'autophagie peut dès lors être responsable du début de la maladie.

Dans la phase tardive de la maladie, l'autophagie peut jouer un rôle opposé en activant les cellules stellaires et en stimulant le développement de la fibrose hépatique [65]. L'activation de l'autophagie par différentes voies pourrait diminuer le développement de la stéatose, de la stéatite non alcoolique (NASH) et du développement à long terme d'hépatocarcinome [66].

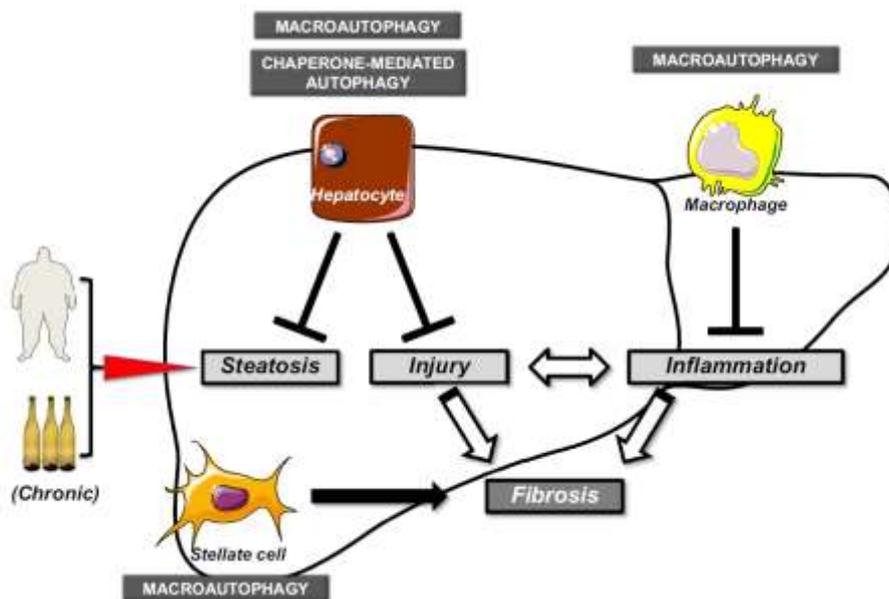


Figure 4.21– Schéma représentant l'autophagie et le développement de pathologies hépatiques chroniques [64].

L'autophagie joue un rôle clé dans la régulation des lipides hépatiques. Chez les souris obèses, l'hyperinsulinisme est responsable d'une hyperactivation de mTOR et secondairement de la diminution des protéines Atg5, Atg7 et Bécline1 entraînant une baisse de l'autophagie. En stimulant l'expression d'Atg7 chez les souris obèses, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont améliorées [59,67].

#### 4.4.11.3. Ischémie-reperfusion du foie

La transplantation hépatique ainsi que la résection d'une partie du foie dans le cadre de pathologies graves ou terminales sont des éléments qui entraînent, lors de la chirurgie, des phénomènes d'ischémie-reperfusion. L'ischémie-reperfusion per-opératoire peut être responsable de complications menant au dysfonctionnement secondaire de l'organe. De nombreux mécanismes physiopathologiques sont impliqués dans l'ischémie-reperfusion tels que la production de radicaux libres, l'inflammation excessive, la suractivation de l'autophagie, la dysfonction mitochondriale et le stress du réticulum endoplasmique. La protéine mTOR joue un rôle protecteur majeur dans la régulation de l'autophagie et de l'inflammation liées à l'ischémie-reperfusion [68].

L'AMPK est activée rapidement pour répondre à une augmentation du rapport AMP/ATP ou ADP/ATP. L'AMPK inhibe mTORC1 et stimule l'autophagie. Cependant, elle agit comme une arme à double tranchant : bénéfique durant l'ischémie par compensation de la baisse d'ATP mais néfaste durant la reperfusion par suractivation et mort cellulaire [69].

#### **4.4.11.4. Consommation d'alcool**

##### **4.4.11.4.1. Consommation aigue**

L'éthanol est oxydé par l'alcool déshydrogénase pour former l'acétaldéhyde qui, via la formation d'acétate, peut alimenter la voie de l'acétyl-coA et la production d'acides gras mais peut également avoir un effet direct sur le ratio NAD/NADH responsable des lésions mitochondriales des hépatocytes. La consommation aigue d'alcool active l'autophagie pour combattre son effet toxique. L'autophagie joue un rôle essentiel dans l'élimination des gouttelettes lipidiques (amplificatrices de ROS) et l'élimination des mitochondries endommagées productrices de radicaux libres [70].

##### **4.4.11.4.2. Consommation chronique**

La consommation chronique d'alcool entraîne une inhibition de l'AMPK, une diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale avec augmentation de la lipogenèse et une suppression de l'autophagie (inactivation de la voie de l'AMPK et inhibition du transport vésiculaire nécessaire à la formation des autophagosomes).

Il y a accumulation d'agrégats protéiques, lésion des lysosomes hyperactivation de Nrf2 par accumulation de SQSTM1/p62 et accumulation de mitochondries endommagées, ce qui conduit à la mort cellulaire.

#### **4.4.11.5. Les hépatites et l'autophagie**

Les virus de l'hépatite B et C sont responsables de pathologies hépatiques chroniques pouvant conduire à la cirrhose et à la dégénérescence néoplasique. Ils activent la xénophagie dans une première phase mais peuvent non seulement interagir avec des protéines de l'autophagie mais également exploiter ce mécanisme pour leur réplication et leur dissémination. Les virus de l'hépatite détournent le phénomène d'autophagie à leur propre avantage. Ils stimulent l'activité du complexe Bécline 1/Vps34 qui permet la formation d'autophagosomes. Les protéines de l'autophagie ainsi que les membranes formées permettent au virus sa réplication et sa multiplication [71].

#### **4.4.11.6. Le développement de tumeurs hépatiques (Figure 4.22)**

L'autophagie basale permet une stabilité génomique au sein des cellules normales et agit en tant que suppresseur de tumeur. Le dysfonctionnement de l'autophagie est responsable du développement de tumeurs hépatiques. L'altération du mécanisme d'autophagie permet l'accumulation intracellulaire de protéines et organelles non fonctionnels entraînant un stress oxydatif, génotoxique et l'altération de gènes transformant la cellule normale en cellule maligne [60].

Dans les cellules normales, l'autophagie est un mécanisme anti-tumoral par protection de la cellule contre les dommages de l'ADN et par diminution de l'inflammation. L'autophagie dégrade les mitochondries dépolarisées ou lésées productrices de radicaux libres (ROS) qui endommagent l'ADN cellulaire et qui sont responsables de mutations favorables au développement tumoral. La diminution de la capacité autophagique est une caractéristique retrouvée dans le développement de nombreux cancers. La délétion d'un allèle du gène Bécline 1 qui constitue un gène autophagique essentiel a été retrouvé dans différents types de cancer tels que le cancer du côlon, de la prostate, les gliomes, l'ovaire, le cerveau et le sein [72,73].

Cependant, lorsque la tumeur est établie, un déséquilibre de l'autophagie peut contribuer à la survie des cellules tumorales en leur apportant les substrats nécessaires à leur survie [74,75]. Il est donc établi que le rôle de l'autophagie peut se modifier durant la progression de la tumeur en supprimant l'initiation des tumeurs dans les tissus normaux ou dysplasiques et en favorisant leur progression lors de chimiothérapie [76].

L'inhibition des gènes de l'autophagie favorise le développement de tumeurs au niveau du foie. L'inhibition de l'autophagie est responsable d'une accumulation de SQSTM1/p62 et de l'activation de la voie NF $\kappa$ B et Nrf2 [60]. L'activation secondaire de Nrf2 redirige le glucose et la glutamine vers une voie anabolique qui permet la prolifération tumorale [77,78].

Certaines protéines clés sont impliquées dans la tumorigenèse hépatique : la suppression de BECN1 (ATG6, Becline 1) cause le développement de cancer chez la souris, [79] tandis que la suppression de SQSTM1 réduit le développement de cancer [80].

Le p53, gène suppresseur de tumeur, a un rôle double comme régulateur de l'autophagie. Au niveau du noyau cellulaire, le p53 agit comme un inducteur de transcription pour l'autophagie tandis que dans le cytoplasme, le p53 agit comme un inhibiteur de l'autophagie et sa dégradation est nécessaire pour induire l'autophagie [81].

Dans le cadre des hépatocarcinomes, l'autophagie induite par la tumeur peut bloquer les effets anti-tumoraux des suppresseurs de tumeur comme le p53 et être responsable de la chimiorésistance des cellules néoplasiques par diminution du potentiel apoptotique de ces cellules ou maintenir la tumorigenèse par activation des protéines Ras. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie pourraient restaurer la sensibilité des cellules néoplasiques aux traitements anti-cancéreux [82].

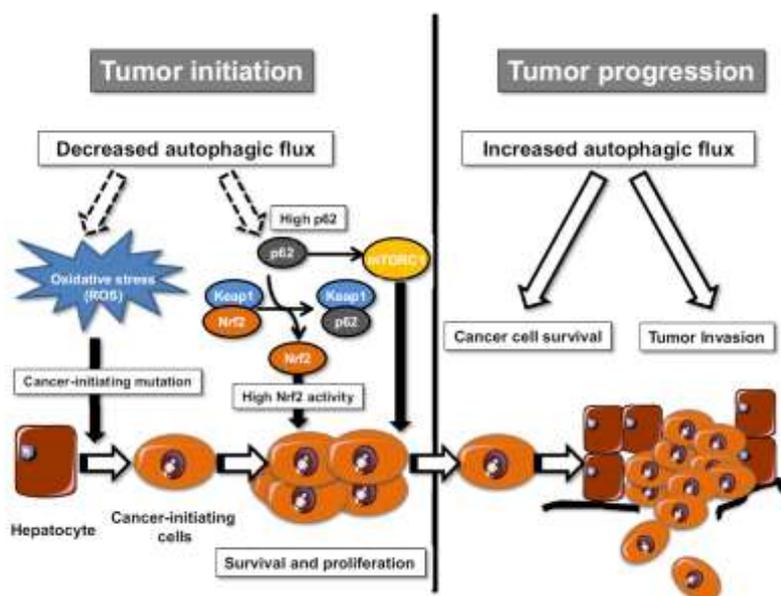


Figure 4.22– Dualité de l'autophagie dans le développement tumoral [64].

L'autophagie peut également promouvoir le développement de l'hépatocarcinome. Les cellules cancéreuses détournent ce phénomène pour leur propre survie dans des conditions environnementales défavorables telles que la déprivation en nutriments, l'hypoxie ou les traitements anti-cancéreux. L'hypoxie induit un stress oxydant au sein des cellules qui présentent un nombre augmenté d'autophagosomes signant une activation de l'autophagie pour leur survie. L'HIF1 stimule les protéines BNIP3 et BNIP3L, celles-ci se fixent sur Bcl2 ce qui libère Bécline 1 et active l'autophagie. De plus, l'autophagie permet l'élimination des mitochondries défectueuses productrices de radicaux libres responsables de la mort cellulaire.

Ainsi, les cellules tumorales ont souvent une capacité autophagique déficiente. L'inhibition de l'autophagie entraîne le développement de zones de nécrose importante avec infiltration des macrophages et des lymphocytes et développement d'un processus inflammatoire avec expression de NF- $\kappa$ B et de cytokines. Cette inflammation stimule la croissance des cellules adjacentes tumorales et entraîne la croissance de la tumeur. A l'inverse, l'autophagie peut aider la cellule cancéreuse à faire face à un stress métabolique/énergétique et lui permet d'éliminer les mitochondries, siège cellulaire majeur de la mort cellulaire induite par voie intrinsèque. La cellule cancéreuse peut ainsi devenir résistante à des agents anticancéreux agissant par le biais d'un stress métabolique grâce à l'induction de l'autophagie. L'inhibition de cette dernière peut alors restaurer une sensibilité des cellules tumorales à l'agent anticancéreux inducteur d'un stress métabolique.

## 4.5. Bibliographie

- (1) Codogno P, Meijer A. Autophagy in the liver. *J of Hepatol.* 2013 Aug 59(2):389-91.
- (2) Yang YP, Hu LF, Zheng HF, Mao CJ, Hu WD, Xiong KP, Wang F, Liu CF. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May; 34(5) :625-35.
- (3) Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956 Jul 25; 2(4 Suppl):179-84.
- (4) Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy.* 2008 Aug; 4(6):740-3.
- (5) Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993 Oct 25; 333(1-2):169-74.
- (6) Lin PW, Chu ML, Liu HS. Autophagy and metabolism. *Kaohsiung J Med Sci.* 2020 Oct 5.
- (7) Tekirdag K, Cuervo AM J. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *Biol Chem.* 2018 Apr 13; 293(15):5414-5424.
- (8) Harazi Y, Bravo-San Pedro JM, Hetz C, Galluzzi L, Kroemer G. Autophagy in hepatic adaptation to stress. *Journal of Hepatology* 2020 Jan; vol.72: 183-196.
- (9) Puyal J, Ginet V, Vaslin A. The two faces of autophagy in the nervous system. *Med Sci.* 2009 Apr; 25(4):383-90.
- (10) Yang Z, Klionsky D. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 335:1-32.
- (11) Levine B, Klionsky D. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *J Dev Cell.* 2004 Apr; 6(4):463-77.
- (12) Vamecq J. Cours 8 : Inflammasome et autophagie. Cours U Mons, pharmacologie spéciale, 1<sup>er</sup> Master en Sciences biomédicales.
- (13) Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. Role of the Atg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 May; 35(5):553-61.
- (14) Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 2014 Jul; 24(7):400-6.
- (15) Po-Yuan Ke. Mitophagy in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Cells.* 2020 Apr; 9(4): 831.
- (16) Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 2010 Apr 2; 584(7):1302-12.
- (17) Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 2011 Jun 17; 332(6036):1429-33.
- (18) Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research.* 2010; 20: 748-762.
- (19) Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12; 279(46):47704-10.
- (20) Kim KH, Lee MS. Autophagy- a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10,322-337.
- (21) Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, Colombo MI. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2004 Jun 1; 117(Pt 13):2687-97.
- (22) Mizushima N, Murphy LO. Autophagy assays for biological discover and therapeutic development. *Trends Biochem Sci.* 2020 Dec; 45(12) :1080-1093.
- (23) Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007; 3(6):542-5.
- (24) Karim MR, Kanazawa T, Daigaku Y, Fujimura S, Miotto G, Kadowaki M. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells. *Autophagy* 2007; 3: 553–560.
- (25) Nakatogawa N, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):458-67.
- (26) Piracs K, Nagy P, Varga A, Venkei Z, Hegedus K, Juhasz G. Advantages and Limitations of Different p62-Based Assays for Estimating Autophagic Activity in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 2012; 7(8):e44214.
- (27) Nezis IP, Stenmark H. p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 17(5):786-93.
- (28) Barth S, Glick D, Macleod K. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221:117-124.
- (29) Klionsky DJ and al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2016; 12(1):1-222.

- (30) Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol* 2009; 452: 1–12.
- (31) Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46:210–240.
- (32) M. Laplante and D. M. Sabatini, “mTOR signaling in growth control and disease,” *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, 2012.
- (33) Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* 2015 Sep; 25(9):545-55.
- (34) Kondratskiy A, Yassine M, Kondratska K, Skryma R, Slomianny C, Prevarskaya N. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front Physiol.* 2013; 4:272.
- (35) Moruno F, Pérez-Jiménez E, Knecht E. Regulation of autophagy by glucose in Mammalian Cells. *Cells.* 2012; 1:372-395.
- (36) Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1/2. *Nature Cell Biology.* 2011; 13:132-141.
- (37) Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene.* 2004; 23:3898-3904.
- (38) Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis CA, Bossis I. Depletion of type IA regulatory subunit (RI $\alpha$ ) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Human Molecular Genetics.* 2006 (15): 2962-2971.
- (39) Feng Z., Hu W., de Stanchina E., et al. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research.* 2007; 67(7):3043–3053.
- (40) Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JKN signaling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep.* 2015; 35(3): e00199.
- (41) Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-Induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 2010; 277(1):2-21.
- (42) Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagy pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 414(1):5-8.
- (43) Chatterjee C, Sparks DL. Hepatic Lipase Release is inhibited by a purinergic Induction of Autophagy. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 33:883-894.
- (44) Chatterjee C, Sparks DL. Extracellular nucleotides inhibit insulin receptor signaling, stimulate autophagy and control lipoprotein secretion. *PLoS One.* 2012; (5): e36916.
- (45) Rickenbacher A, Jang JH, Limani P, Ungethüm U, Lehmann K, Oberkofler CE, Weber A, Graf R, Humar B, Clavien PA. Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice. *J Hepatol.* 2014; 61(2):301-8.
- (46) Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, Lotze MT. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol.* 2010; 190(5):881-92.
- (47) Khambu B, Yan S, Huda N, Yin XM. Role of High-Mobility Group Box-1 in liver pathogenesis. *Int Mol Sci.* 2019;20(21):5314.
- (48) Zhu X, Messer JS, Wang Y, Lin F, Cham CM, Chang J, Billiar R, Lotze MT, Boone DL, Chang EB. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J Clin Invest.* 2015; 125(3):1098-110.
- (49) Marquez RT, Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res.* 2012; 2(2):214-221.
- (50) Luo S, Rubinsztein DC. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1247-50.
- (51) Onodera J, Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem.* 2005; 280:31582–31586.
- (52) Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009; 458(7242):1131–1135.
- (53) Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010; 11(6):467–478.
- (54) Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(10):774–785.
- (55) Efeyan A, Zoncu R, Chang S, Gumper I, Snitkin H, Wolfson RL, et al. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* 2013; 493; 679–683.

- (56) Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005; 169:425–434.
- (57) Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14:170–184.
- (58) Ueno T, Ezaki J, Kominami E. Metabolic contribution of hepatic autophagic proteolysis: old wine in new bottles. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824:51–58.
- (59) Komatsu M. Liver autophagy: physiology and pathology. *J Biochem* 2012; 152:5–15.
- (60) Di Fazio P, Matrood S. Targeting autophagy in liver cancer, *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2018; 3: 39.
- (61) S. Chu A, H. Perlmutter D, Wang Y. Capitalizing on the Autophagic Response for Treatment of Liver Disease Caused by Alpha-1-Antitrypsin Deficiency and Other Genetic Diseases. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 459823.
- (62) Polishchuk E, Merolla A, Lichtmannegger J, Romano A, Indrieri. Activation of autophagy, observed in liver tissues from patients with Wilson Disease and from ATP7B-deficient animals, protects hepatocytes from copper-induced apoptosis. *Gastroenterology* .2019; vol 156 (4):1173-1189.
- (63) Cho JH, Kim GY, Pan CJ, Anduaga J, Choi EJ, Mansfield BC, Chou JY, Cho JH, et al. Downregulation of SIRT1 signaling underlies hepatic autophagy impairment in glycogen storage disease type Ia. *PLoS Genet.* 2017 May 30; 13(5):e1006819.
- (64) Gual Ph, Gilgenkrantz H, Lotersztajn S. Autophagy in chronic liver diseases: the two faces of Janus. *Am J Physiol cell Physiol* 2017; 312: C263-C273.
- (65) Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio D, Jiang H, Schwabe RF, Hillman EMC, Piantedosi R, Libien J. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun; 1791(6): 467–473.
- (66) Gluchowski NL, Becuwe M, Walter TC, Farese RV. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*2017 ;14(6) :343-355.
- (67) Hidvegi T, Ewing M, Hale P, Dippold C, Beckett C, Kemp C, et al. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* 2010; 329:229–232.
- (68) Zhang T, Guo J, Gu J, Huili Li KC, Wang J. Protective role of mTOR in liver ischemia/reperfusion injury: involvement of inflammation and autophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 13; 2019:7861290.
- (69) Daniels L. J., Varma U., Annandale M., Chan E., Mellor K. M., Delbridge L. M. D. Myocardial energy stress, autophagy induction, and cardiomyocyte functional responses. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2019; 31(6):472–486.
- (70) Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, Lu B, Stolz DB, Clemens DL, Yin XM. Autophagy Reduces Acute Ethanol-Induced Hepatotoxicity and Steatosis in Mice. *Gastroenterology.* 2010 Nov; 139(5): 1740–1752.
- (71) Wang J, Liu JY, Shao KY, Han YQ, Li GL, Ming SL, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates lipophagy to facilitate viral replication through downregulation of NDRG1 expression. *J Virol.* 2019; 93(17):e00526–e00519.
- (72) Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999; 402:672–676.
- (73) Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G, Miracco C. The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy.* 2009; 5:930–936.
- (74) Singh SS, Vats S, Chia AY, Tan TZ, Deng S, Ong MS, Arfuso F, Yap CT, Goh BC, Sethi G, Huang RY, Shen HM, Manjithaya R, Kumar AP. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2018 Mar; 37(9):1142-1158.
- (75) Liu L, Liao J, He X, Li P. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget* 2017;18; 8(34):57707-57722.
- (76) White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5308–5316.
- (77) Mathew R, Karp C, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray k, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, DiPaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E. Autophagy Suppresses Tumorigenesis Through Elimination of p62. *Cell.* 2009 Jun 12; 137(6): 1062–1075.
- (78) Rautou PE, Mansouri A, Lebec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* 2010; 53:1123–1134.
- (79) Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003 Dec; 112(12):1809-20.

- (80) Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011 Apr 15; 25(8):795-800.
- (81) Levine B, Abrams J. p53: The Janus of autophagy? *Nat Cell Biol.* 2008 Jun; 10(6): 637–639.
- (82) Tian Y, Kuo CF, Sir D, Wang L, Govindarajan S, Petrovic LM, Ou JH. Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death Differ.* 2015; 22:1025–1034.

## CHAPITRE 5 : OBJECTIF ET CADRE DES TRAVAUX DE THÈSE

Comme évoqué dans l'Avant-propos, l'objectif de cette thèse entre dans le cadre de la triangulation foie / jeûne pré-opératoire / anesthésie. L'objectif est plus précisément pour l'anesthésiste de comprendre si le jeûne et quel type de jeûne est bénéfique ou néfaste pour la fonction hépatique et par là pour le patient. Quelles sont les bases moléculaires sous-jacentes aux rôles bénéfiques ou à l'inverse délétères que peut jouer le jeûne à l'égard de ce monument de l'homéostasie métabolique et énergétique qu'est le foie ? En préambule à la présentation des résultats scientifiques de mes travaux de doctorat, je rappellerai comment la perception médicale de cette triangulation médicale foie/jeûne/anesthésie avec ses nuances, a pu historiquement évoluer. Je me focaliserai au terme de ce court chapitre sur les résultats précédemment obtenus dans le même modèle expérimental de foie de rat isolé perfusé pour préciser le point de départ de mes travaux de doctorat.

### 5.1. L'arrière-plan historique

L'effet nocif du jeûne pré-opératoire a été mis en exergue par Joseph Lister en 1883 [1]. Toutefois, dans le contexte d'une chirurgie programmée, la notion de "rien par la bouche" après minuit a été introduite après la deuxième guerre mondiale à cause du risque d'inhalation du contenu gastrique dans l'estomac au moment de l'induction de l'anesthésie [2]. Bien qu'il n'existe que peu de preuves scientifiques évidentes de son utilité, cette pratique a largement été utilisée durant le 20<sup>ème</sup> siècle.

### 5.2. Considérations médicales récentes d'intérêt

Durant la période péri-opératoire, le remplacement de l'eau, des ions, des protéines et/ou des électrolytes est nécessaire pour contrecarrer les effets physiopathologiques liés à la procédure chirurgicale. Sendak affirme que chez la plupart des patients (adultes et enfants) devant subir une intervention chirurgicale mineure, l'administration peropératoire de dextrose ne serait pas nécessaire. L'administration postopératoire de solutions glucosées peut être envisagée de manière appropriée lorsque le risque d'hypoxie et d'ischémie cérébrales est écarté. Cependant, certains patients sont à risque de développer une hypoglycémie peropératoire et nécessitent une administration de solution glucosée péri-opératoire (adultes et enfants recevant une alimentation parentérale totale, les enfants de mère diabétique, les prématurés et les diabétiques sous perfusion continue d'insuline ou sous antidiabétiques oraux) [3,4].

D'autre part, ces dernières décennies, la notion de « rien par la bouche » à partir de minuit a été remise en question [5,6].

Actuellement, un jeûne de 6h pour les solides et 2h pour les liquides clairs est préconisé avant la chirurgie élective et reste sûre pour le patient [7]. Des études plus récentes ont démontré que le jeûne préopératoire pour une chirurgie élective induit un état métabolique néfaste pour les patients [8].

Le jeûne pré-opératoire d'une nuit que l'on impose en routine diminue les réserves d'hydrates de carbone et change le métabolisme par rapport à l'état nourri présent durant la journée [9]. Cette différence de métabolisme durant la chirurgie peut modifier la réponse du patient au stress chirurgical et entraîner une résistance à l'insuline en phase post-opératoire [10].

Par ailleurs, le jeûne pré-opératoire altère les réponses de l'organisme au stress, diminue la fonction hépatique en agissant sur les cellules de Kupffer du système réticuloendothélial hépatique [11].

En transplantation hépatique, la dénutrition du donneur liée à un séjour prolongé aux soins intensifs ou à un manque d'apport nutritionnel adéquat peut entraîner une augmentation de l'incidence des lésions hépatocellulaires et de non fonction primaire du greffon [12].

### **5.3. Point de départ et évolution des travaux de doctorat**

Dans le cadre de l'anesthésie, étant confrontée quotidiennement à des patients à jeun devant subir une chirurgie et à qui nous administrons des médicaments potentiellement hépatotoxiques, je me suis posée la question de l'effet néfaste potentiel que pourrait induire le jeûne chez les patients chirurgicaux, notamment au vu des considérations médicales récentes mentionnées ci-avant. Mes recherches bibliographiques ont fait apparaître que de nombreuses études expérimentales démontraient que les foies provenant d'animaux nourris étaient plus résistants aux lésions d'ischémie-reperfusion que les foies de rats à jeun. Dans ces modèles animaux, des études « *in vivo* » et « *in vitro* » ont notamment démontré que le jeûne exacerbait les lésions d'ischémie-reperfusion [13, 14, 15].

Antérieurement, Stadler et al. ont démontré que les foies provenant de rats à jeun, exposés à une perfusion *ex-vivo* prolongée ou à des phases d'ischémie-reperfusion étaient plus sensibles à la cytolysse que les foies de rats nourris. Dans cette expérimentation, les altérations du foie soumis à une perfusion *ex-vivo* continue étaient plus importantes que les altérations liées à l'ischémie-reperfusion elle-même [16]. Dans ce contexte, j'ai voulu comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets délétères liés au jeûne rencontrés dans ce modèle de foie de rat perfusé *ex- vivo*, les foies de rat à jeun 18h étant plus sensibles à la cytolysse que les foies de rats nourris. La réponse à cette question et celles aux nouvelles questions alors s'imposant ont guidé le cheminement de ma réflexion scientifique tout au long du parcours de thèse. Les différents chapitres qui suivent résument les avancées obtenues dans la recherche des mécanismes moléculaires sous-jacents aux observations successives réalisées sur le modèle expérimental du foie murin isolé perfusé.

## **5.4. Bibliographie**

- (1) Lister J. On Anaesthetics, Partie III. Holmes's System of Surgery, Vol.III, 3<sup>ème</sup> ed. London, 1883. Réimprimé dans: The collected Papers of Joseph Lister, Birmingham: The Classics of Medicine Library 1979: pp 135-175.
- (2) Mendelson CL. The aspiration of stomach contents into lungs during obstetric anesthesia. Amer J Obstet Gynecol 1946; 52:191-205.
- (3) Sendak MJ. Monitoring and management of perioperative electrolyte abnormalities, acid-base disorders, and fluid replacement. In Principles and Practice of Anesthesiology. Second Edition.
- (4) Longnecker DE, Tinker JH and Morgan GE Jr (Eds). Mosby, St. Louis, Missouri USA, 1998: pp 942-1010.
- (5) The shortened fluid fast and the Canadian Anaesthetists' Society's new guidelines for fasting in elective/emergency patients. Can J Anaesth 1990; 37: 905-906.
- (6) Eriksson LI, Sandin R. Fasting guidelines in different countries. Acta Anaesthesiol Scand 1996; 40: 971-974.
- (7) Van Ginhoven TM, Mitchell JR, Verweij M, Hoeijmakers JHJ, Ijzermans JNM, de Bruin RWF. The use of preoperative nutritional interventions to protect against hepatic ischemia-reperfusion injury. Liver Transpl; 2009 oct; 15(10): 1183-91.
- (8) Diks J, van hoorde DE, Nijveldt RJ, Boelens PG, Hofman Z, Bouritius H, van Norren K, van Leeuwen PA. Preoperative Fasting: an outdated concept? J Parenter Enteral Nutr 2005; 29: 298-304.
- (9) Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with <sup>13</sup>C NMR. Science 1991; 254:573-576.
- (10) Brandi LS, Santoro D, Natali A, Altomonte F, Baldi S, Frascerra S, Ferrannini E. Insulin resistance of stress: sites and mechanisms. Clin Sci (Lond) 1993; 85:525-535.
- (11) Longarela A, Olarra J, Suarez L, Garcia de Lorenzo A. Metabolic response to stress, can we control it? Nutr Hosp 2000; 15:275-279.
- (12) Pruijm J, Van Woerden WF, Knol E, Klompmaker JJ, de Bruijn KM, Persijn GG, Slooff MJ. Donor data in liver grafts with primary non-function-a preliminary analysis by the European Liver Registry. Transplant Proc 1989; 21:2383-2384.
- (13) Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. Hepatology 1999; 29:1139-1146.
- (14) Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Caraceni P, Van Thiel D. Fasting enhances the effects of anoxia on ATP, Cai<sup>++</sup>, and cell injury in isolated rat hepatocytes. Biochim Biophys Acta 1993; 1178:9-19.
- (15) Bradford BU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG. New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. J Pharmacol Exp Ther. 1986 Jan; 236(1):263-8.
- (16) Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an *ex-vivo* perfused rat liver. Anesthesiology 2005; 103: 978-986.

## CHAPITRE 6 : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### 6.1. Importance de la nature énergétique du mécanisme protecteur

Un premier travail publié dont la présentation est développée ci-après aboutit à la conclusion que *l'hépatoprotection du foie isolé requiert que soit dépassé un seuil énergétique.*

#### **1er article publié : Le jeûne court (de 18 h) ne protège pas le foie de rat perfusé ex-vivo contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Importance d'une charge énergétique cellulaire minimale**

#### Résumé

**Objectif :** La restriction alimentaire ou la réduction de l'apport alimentaire aide à la protection contre les lésions ischémiques rénales et hépatiques. Dans ce cadre, il a récemment été démontré qu'un jeûne court protège le foie de rat in situ contre l'ischémie-reperfusion. Dans notre étude, des foies perfusés *ex-vivo* ont été exposés à l'ischémie-reperfusion afin d'étudier l'impact de la déconnexion du foie avec perte de l'approvisionnement extra-hépatique en substrats énergétiques sur la protection donnée par le jeûne court.

**Méthodes :** Des foies de rats à jeun 18h et nourris, ont été perfusés *ex-vivo* et soumis à une ischémie-reperfusion. La libération de marqueurs de cytolyse dans le perfusat a été étudiée dans les 2 conditions nutritionnelles. Les réserves énergétiques disponibles dans le temps et les charges énergétiques cellulaires sous la forme de  $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  ainsi que le glycogène ont été mesurés à différents temps dans les foies.

**Résultats :** Le jeûne court en comparaison au statut nourri ne protège pas les foies de rats perfusés *ex-vivo* contre l'ischémie-reperfusion, augmentant la libération de marqueurs de cytolyse (potassium, cytochrome c, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase et lactate déshydrogénase) dans le perfusat durant la phase de réoxygénation. La toxicité d'un jeûne court par rapport à l'état nourri a été associée à des charges en glycogène et énergétiques plus faibles dans le foie, et à des niveaux de lactate plus faibles dans le perfusat.

**Conclusion :** Une charge énergétique élevée, un contenu intracellulaire en glycogène et une activité glycolytique peuvent protéger le foie contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Ce travail ne remet pas en question le rôle protecteur précédemment démontré dans la littérature pour la restriction alimentaire et le jeûne court. Ce travail émet l'hypothèse que le dépassement de la valeur seuil de 0,3 pour la charge énergétique pourrait déterminer l'efficacité de ce rôle protecteur.

#### Introduction

Il a été démontré que la restriction alimentaire induit une protection dans une variété d'organismes contre diverses lésions et contre le vieillissement [1-6]. Une protection par la restriction alimentaire et le jeûne a été documentée contre les lésions de nombreux organes, notamment le cerveau [7], le cœur [8-11], les reins [12], l'intestin [13] et le foie [14]. Une certaine difficulté concernant la restriction alimentaire pourrait cependant être le grand nombre de conditions efficaces véhiculées sous cette appellation. Même s'il est implicitement entendu que la restriction alimentaire exclut la malnutrition, cette restriction alimentaire sans malnutrition peut être satisfaite par des manipulations alimentaires qualitatives (privation d'un ou deux acides aminés, par exemple) et/ou quantitatives (apport calorique réduit). Dans les protocoles de restriction alimentaire résultant d'une diminution de l'apport protéique ou de la suppression d'un seul acide aminé dans l'alimentation, notamment la méthionine, les mécanismes

de protection sous-jacents ont récemment reçu un nouvel éclairage grâce notamment au contrôle de la production endogène de sulfure d'hydrogène par la voie de transsulfuration [15-17] et aux propriétés de signalisation présentées par ce gaz physiologique [18,19]. En ce qui concerne l'aspect de l'apport calorique de la restriction alimentaire, qui entre à priori dans un autre domaine, peu de choses ont finalement été faites pour mettre en relation le tonus énergétique cellulaire avec les protections observées. On a récemment signalé qu'un jeûne court protégeait le foie contre les lésions d'ischémie-reperfusion dans des conditions où le tissu était étudié dans des organismes entiers [14]. Pendant un jeûne court (18-24 heures de jeûne), les réserves énergétiques ne sont pas épuisées et les substrats énergétiques sont mobilisés d'une manière distincte de l'apport énergétique durant l'alimentation. En cas de jeûne et de restriction alimentaire qui n'est pas associée à la malnutrition, l'organisme dispose de réserves suffisantes pour répondre aux demandes énergétiques exprimées par les cellules et les tissus. Tant que l'organisme ne présente pas d'hypoglycémie, ce raisonnement est valide. À ce jour et à notre connaissance, aucun des protocoles de restriction alimentaire développés expérimentalement ou en pratique n'a été associé à l'hypoglycémie. Par conséquent, même si la nature des substrats disponibles et l'apport énergétique peuvent être différents, rien n'indique que la disponibilité énergétique est elle-même physiologiquement réduite dans la restriction alimentaire par rapport au régime dit normal.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de l'ischémie-reperfusion normothermique sur l'intégrité hépatique en utilisant différents marqueurs biologiques avec une attention particulière aux nucléotides de l'adénosine, c'est-à-dire l'adénosine triphosphate (ATP), l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine monophosphate (AMP), dans un modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo*. Nous démontrons que le jeûne en comparaison à l'état nourri ne protège pas contre les lésions liées à l'ischémie-reperfusion. A l'opposé, le statut nourri et non le jeûne court était, dans cette configuration, protecteur et cette protection était associée à un meilleur état énergétique du foie nourri. Bien qu'en contradiction avec les propriétés protectrices bien établies de la restriction alimentaire et du jeûne court mentionnées ci-dessus sur le foie et d'autres tissus, le présent travail ne remet pas en question les avantages de la restriction alimentaire pour la santé. Néanmoins, comme nous le verrons plus loin, il pourrait désormais mettre en évidence la nécessité d'une disponibilité énergétique minimale dans la protection offerte par la restriction alimentaire.

## Matériels et méthodes

### Animaux

Des rats Wistar femelles achetés à Harlan Nederland (Horst, Pays-Bas) d'un poids corporel de 150-200 g ont été acclimatés pendant au moins cinq jours à la température ambiante de 24-26°C avec un cycle lumière-obscurité de 12:12 h. De la nourriture et de l'eau de laboratoire standard ont été fournies *ad libidum*. Les rats ont été répartis au hasard dans des groupes nourris et à jeun (n = 10 dans chaque groupe). Dans les expériences utilisant des animaux à jeun, la nourriture a été retirée 18 heures avant le début de l'expérimentation tout en gardant un accès libre à l'eau. Tous les animaux utilisés dans cette étude ont été soignés dans nos installations de recherche sur les animaux. L'expérience a été réalisée après avoir reçu l'approbation du Comité de protection des animaux de l'Université libre de Bruxelles (CEBEA-IBMM-2014-39).

### Solution et produits chimiques

La solution saline équilibrée de Hank (HBSS) sans albumine a été obtenue comme décrit précédemment [20]. En bref, la composition de cette solution était de 0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 0,048 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 g/l CaCl<sub>2</sub>, 2,38 g/l HEPES, 1 g/l glucose et 35 U/L d'insuline. Tous ces produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma (Bornem, Belgique). La solution a été saturée avec 100% d'O<sub>2</sub> (0,5 L/min), ajustée à un pH de 7,35 ± 0,05 avec du NaOH 1,0 M et complétée avec du NaCl pour atteindre 300 mOsm. Les gaz de perfusion (RAPID LAB, Chiron Diagnostics, Halstead, Royaume-Uni) ont été mesurés à l'entrée et dans l'effluent pour assurer une oxygénation adéquate.

Le substrat énergétique qui faisait partie de la solution de perfusion était le glucose et son inclusion a été faite par référence à l'ajout habituel de précurseurs énergétiques assurant la viabilité des cellules dans d'autres milieux de préservation des greffes (par exemple, l'adénosine pour la solution du Wisconsin et le glutamate pour la solution de Celsior [21], le glucose pour la solution de Belzer [22], la solution de Collin [22] et le Polysol [23]).

L'inclusion d'insuline dans la solution de perfusion du foie a été inspirée par la solution du Wisconsin qui contient également de l'insuline à 40 [24] ou 100 U/L [25]. Cette solution s'est avérée assurer des propriétés de préservation du foie *ex-vivo* meilleures que certaines solutions sans insuline, comme l'atteste la préservation de la production de bile et la réduction des complications [25]. La solution du Wisconsin est par ailleurs un milieu habituel encore précieux pour les transplantations de foie [21, 26, 27]. Bien que d'autres mécanismes puissent y contribuer, l'inclusion de l'insuline pourrait être mise en relation avec ses propriétés anti-oxydantes bien connues [28-34]. En règle générale, la préservation des tissus est en effet améliorée par des composés ayant des activités anti-oxydantes.

#### Hépatectomie, protocole expérimental de perfusion, mesures de la teneur en glycogène du foie, des métabolites et des marqueurs de cytolyse dans le perfusé

La préparation et l'utilisation expérimentale des foies perfusés *ex-vivo* ont été précédemment détaillées [20,35,36]. L'expérimentation comportait trois phases : (1) le foie a été perfusé pendant 15 minutes ; (2) la perfusion a été arrêtée pendant 60 minutes, le foie étant conservé à 37°C dans le milieu de perfusion ; (3) la phase de reperfusion durant 60 minutes supplémentaires. À différents moments (0, 10, 15, 75, 90, 105, 120, 135 min après le début de la perfusion), des échantillons de 1 ml ont été prélevés dans le perfusé quittant l'organe. De fines biopsies du foie ont été obtenues à 0 et 135 min et rapidement stockées dans l'azote liquide pour le dosage des nucléotides d'adénosine ou immergées dans du formol à 10%, enrobées dans de la paraffine et traitées par des techniques standards pour l'examen histologique (microscopie optique). Les coupes ont été colorées avec de l'hématoxyline-éosine, et de l'acide périodique schiff (PAS).

La teneur en glycogène du foie et les marqueurs de cytolyse et les métabolites ont été déterminés comme indiqué précédemment [20-22].

#### Nucléotides d'adénosine

La séparation de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) selon la méthode modifiée de Wynants et al. [37,38].

#### *Extraction des tissus*

Les biopsies du foie ont été rapidement stockées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction. Elles ont été homogénéisées dans 1 ml d'acide perchlorique froid à 6% contenant 0,8 mM d'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA) avec un MIXER POTTER (IKA Labortechnik RW 20 n, Staufen, Allemagne). Les homogénats ont été centrifugés pendant 10 min à 10 000 g. 500 µL du surnageant ont été ajustés à un pH de 6,0-7,0 avec 500 µL de solution de KOH 1M, puis centrifugés à nouveau pendant 5 min à 15 000 g, et 700 µL du surnageant ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

#### *Chromatographie liquide haute performance (HPLC)*

Les échantillons extraits ont été analysés avec le système HPLC d'AGILENT TECHNOLOGIES (pompe binaire et compartiment de la colonne de la série 1100, détecteur DAD infini et compartiment de l'échantillonneur modèle 1260 ; Agilent Technologies, Diegem, Belgique) équipé d'une colonne PURSUIT XR5 C18 150 x 4,6 mm (Agilent Technologies, Diegem, Belgique) à température ambiante. Les phases mobiles étaient constituées de la solution A, un tampon de phosphate d'ammonium 10 mM et de chlorure de t-butylammonium 2 mM au pH 7,0 ajusté avec du KOH 1 M, et de la solution B, d'acétonitrile. La colonne a été initialisée avec 70 % de la solution A et 30 % de la solution B pendant 12 min, puis ramenée à 100 % de la solution A pendant 2 min. Le programme d'élution était le suivant : 0 min à 10 min 100% A et 0% B ; 10 min à 11 min de gradient linéaire à 70% A et 30% B, 11 min à 23 min 70% A et 30% B, 23 min à 24 min de gradient linéaire à 100% A et 0% B ; et enfin 100% A et 0% B pendant 2 min. Le débit était de 0,8 ml/min. Le volume d'injection était de 20 µL et les pics d'élution ont été mesurés à 254 nm. Les pics d'ATP, d'ADP et d'AMP ont été identifiés par comparaison avec le temps de rétention des étalons. Les nucléotides adénosine de haute pureté, c'est-à-dire les étalons ATP, ADP et AMP, et tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma (Bornem, Belgique). Les résultats sont exprimés en charge énergétique (CE), qui est le rapport des différentes surfaces sous la courbe de chaque pic selon cette équation ( $CE = [ATP] + 1/2 [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$ ), considérée comme un paramètre fondamental du contrôle métabolique [38]. La valeur ci-dessus peut varier de 0,0 (en présence d'AMP uniquement) à 1,0 (ce qui suggère la conversion complète des molécules d'AMP en ATP).

## Méthodes statistiques

Les résultats biologiques ont été exprimés en terme de moyenne et d'écart-type (SD). Les courbes réponse, dans les différentes conditions expérimentales, ont été obtenues par simple interpolation linéaire entre des points temporels consécutifs (0 - 135 min). Pour les enzymes, une transformation logarithmique a été appliquée pour normaliser les distributions et stabiliser les variances. Tous les calculs statistiques ont ensuite été effectués sur les valeurs transformées. Les courbes réponse ont été comparées par la méthode développée par Zerbe [39]. Cette approche, qui ne fait aucune hypothèse sur le type d'évolution, permet de comparer les courbes réponse non seulement sur toute la période d'étude mais aussi pour des intervalles de temps prédéfinis, c'est-à-dire respectivement avant l'ischémie (0 - 15 min), pendant l'ischémie (15 - 75 min) et après l'ischémie (75 - 135 min).

La comparaison des valeurs entre les groupes a été effectuée par le *test t* de Student. Pour comparer les valeurs dans chaque groupe au temps zéro et après 135 min, un *test t* de Student apparié a été appliqué.

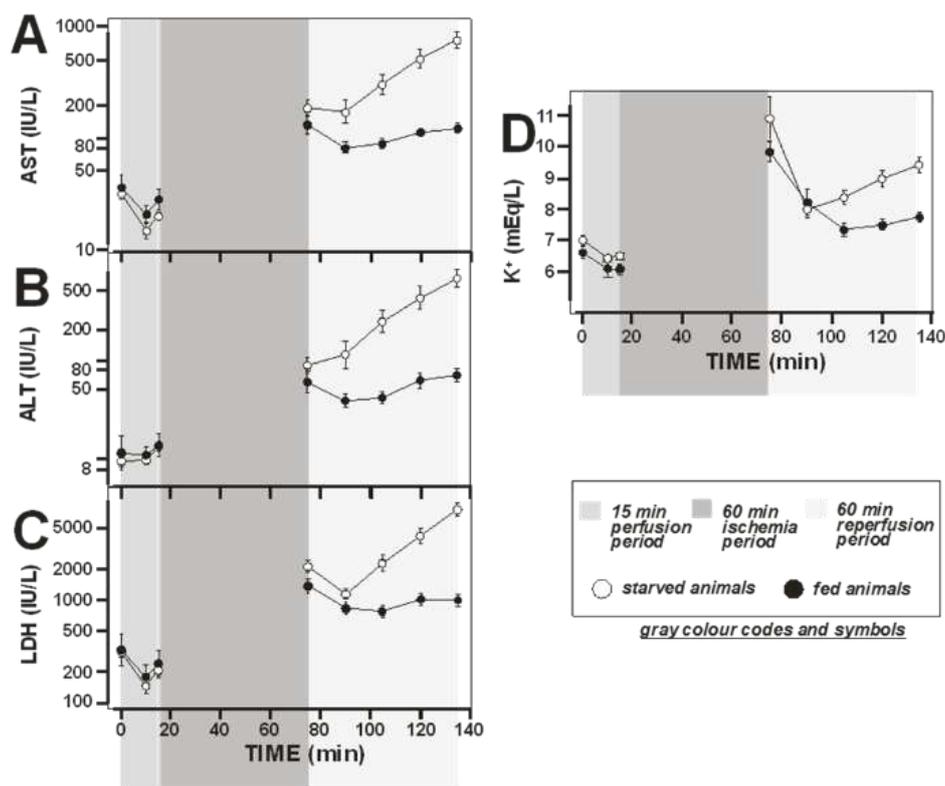
Tous les résultats ont été considérés comme significatifs au niveau critique de 5 % ( $P < 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SAS version 9.1 pour Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA) et S-PLUS version 6.2 pour Windows (MathSoft Inc, Seattle, WA, USA).

## Résultats

Les foies sont apparus de couleur uniforme tout au long de la période d'étude dans les deux groupes.

### Marqueurs de cytolysé dans le perfusat

Comme le montre la figure 1A-D, les profils d'évolution dans le temps des marqueurs de cytolysé, notamment l'AST, l'ALT, la LDH et le potassium, étaient similaires dans chaque groupe, avec une légère diminution immédiatement après le début de l'expérience, suivie d'une augmentation globale de leur libération dans le perfusat jusqu'à la fin de l'expérience. Pendant la phase de réoxygénation, les niveaux d'AST dans le perfusat (**Fig. 6.1.1A**) étaient plus élevés dans le groupe à jeun 18h que dans le groupe nourri ( $P < 0,01$ ). Le profil des courbes des enzymes ALT et LDH étaient similaires à ceux de l'AST, comme le montre la Fig. 1B-C. Bien que la réoxygénation a augmenté la libération d'ALT et de LDH dans les deux groupes, les niveaux d'ALT et de LDH du perfusat étaient plus élevés dans le groupe à jeun 18h que dans le groupe nourri ( $P < 0,01$ ). Dans l'ensemble, l'efflux de potassium chez les rats à jeun 18h était plus important que chez les rats nourris pendant la période expérimentale de 75-135 min ( $P = 0,01$ ) (**Fig. 6.1.1D**). Un pic marqué de libération de potassium, suivi d'une chute rapide, a été observé au début de la reperfusion chez les rats à jeun et les rats nourris (**Fig. 6.1.1 D**). Les valeurs des concentrations d'AST, d'ALT, de LDH et de potassium enregistrées à la fin de l'expérience (135 min) sont également indiquées dans le **tableau 6.1.1**, ainsi que le taux de cytochrome c dans le perfusat, qui était le plus faible dans le groupe nourri ( $P < 0,01$  par rapport aux rats à jeun 18h) (**tableau 6.1.1**).



**Fig. 6.1.1.** Concentrations de marqueurs de cytolysse dans le perfusate de foies *ex-vivo* de rats nourris et à jeun 18h. La figure illustre l'évolution dans le temps des libérations d'aspartate aminotransférase (AST, A), d'alanine aminotransférase (ALT, B), de lactate déshydrogénase (LDH, C) et de cation potassium (D) dans le milieu extracellulaire (perfusate) au cours des différentes phases de l'expérience (moyenne  $\pm$  SD). Pendant la réoxygénation du foie (75 - 135 min), les taux d'enzymes du perfusate étaient plus élevés dans le foie des rats à jeun 18h que dans celui des rats nourris ( $P < 0,01$ ). L'efflux de potassium dans les groupes à jeun 18h était plus important que dans les groupes nourris et a augmenté progressivement pendant la période de réoxygénation de 75-135 min ( $P = 0,01$ ). Les concentrations apparaissant en ordonnée des panneaux A, B et C sont présentées sur une échelle logarithmique. Le nombre de rats étaient  $n$  (nombre d'animaux ou de foies) = 10 dans chaque groupe expérimental ; UI : unité internationale.

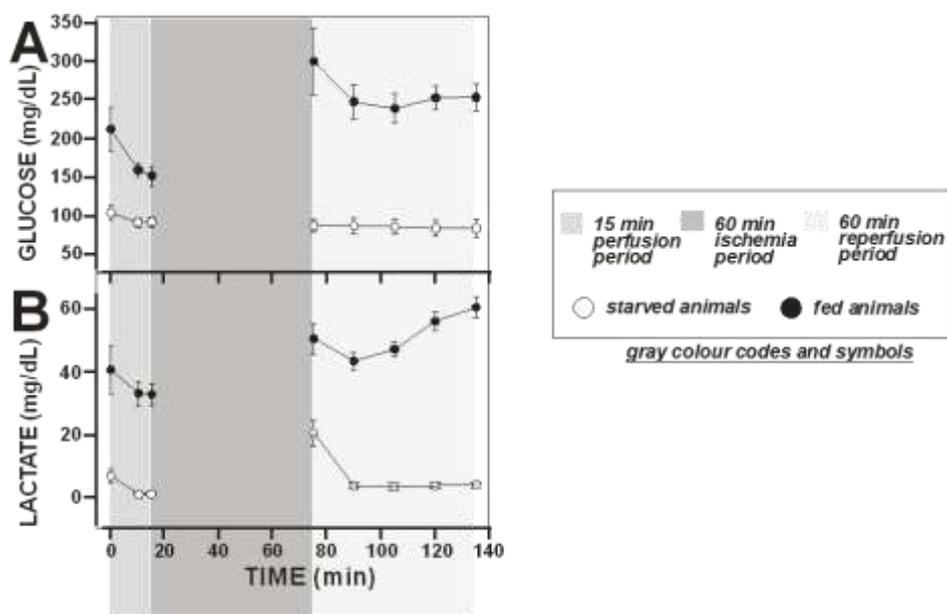
**Tableau 6.1.1. Variables biologiques à 135 min dans le perfusate à l'état nourri et à jeun 18h.**

Cytolysis and metabolic markers	Concentrations in the extracellular medium		<i>P</i> -value (fed vs starved states)
	Origins of perfused <i>ex-vivo</i> livers		
	Fed rats	Starved rats	
<i>Cytolysis markers</i>			
AST (IU/L)	161 $\pm$ 101	826 $\pm$ 478	< 0.01
ALT (IU/L)	84 $\pm$ 31	787 $\pm$ 612	< 0.01
LDH (IU/L)	1,721 $\pm$ 1,336	8,879 $\pm$ 4,545	< 0.01
Cytochrome <i>c</i> (ng/mL)	11.5 $\pm$ 4.9	27.5 $\pm$ 3.0	< 0.01
Potassium (mEq/L)	7.8 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.7	< 0.01
<i>Metabolic markers</i>			
Glucose (mg/dL)	278 $\pm$ 61	84 $\pm$ 38	< 0.01
Lactate (mg/dL)	52.5 $\pm$ 19.5	3.9 $\pm$ 3.6	< 0.01

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. Les variables choisies sont utilisées comme marqueurs de la cytolysse et du métabolisme. Les abréviations sont : AST, aspartate aminotransférase ; ALT, alanine aminotransférase ; LDH, lactate déshydrogénase ; UI, unité internationale.

### Marqueurs métaboliques dans le perfusat

Globalement, les concentrations de glucose étaient les plus élevées dans le groupe nourri par rapport aux rats à jeun ( $P < 0,01$ ). Chez les rats nourris, on a observé un pic de glucose dans le perfusat au moment de la reperfusion. (**Fig.6.1.2A**). L'ischémie a provoqué une élévation du lactate au moment de la reperfusion, principalement dans le groupe nourri ( $P < 0,01$  par rapport au groupe à jeun) (**Fig.6.1.2B**). Les concentrations de glucose et de lactate à la fin des expériences sont également indiquées dans le **tableau 6.1.1**.



**Fig. 6.1.2.** Concentrations de marqueurs métaboliques dans le milieu extracellulaire de foies perfusés ex-vivo de rats nourris et à jeun 18h. La figure illustre l'évolution dans le temps des taux de glucose (A) et de lactate (B) dans le milieu extracellulaire au cours des différentes phases de l'expérience (écart-type moyen). Le glucose et le lactate dans le perfusat étaient plus élevés dans les groupes nourris que chez les animaux à jeun 18h ( $P < 0,01$ ). n (nombre d'animaux ou de foies) = 10 dans chaque groupe expérimental.

### Histologie

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes dans les lames de foie colorées à l'hématoxyline-éosine. Les hépatocytes et les cellules sinusoidales présentaient une morphologie normale. Aucun hépatocyte nécrosé n'a été trouvé. Aucun signe d'inflammation n'était présent. Des changements minimes consistant principalement en hépatocytes occasionnels avec vacuolisation ou ballonnement ont été observés dans les foies des deux groupes de rats à la fin de l'expérience. Des zones de vacuolisation hépatocellulaire, de décollement de la muqueuse endothéliale et de légère congestion sinusoidale ont été observées. Cependant, l'architecture acinaire a toujours été maintenue (données non montrées).

### Teneur en glycogène

Les teneurs en glycogène des foies provenant des différentes conditions expérimentales sont indiquées dans le **tableau 6.1.2**. La teneur en glycogène a été significativement affectée par l'état nutritionnel, étant nettement plus faible chez les rats à jeun 18h par rapport au groupe nourri ( $P < 0,01$ ). La teneur en glycogène a diminué de manière significative dans les groupes à jeun entre 0 et 135 min ( $P < 0,05$ ).

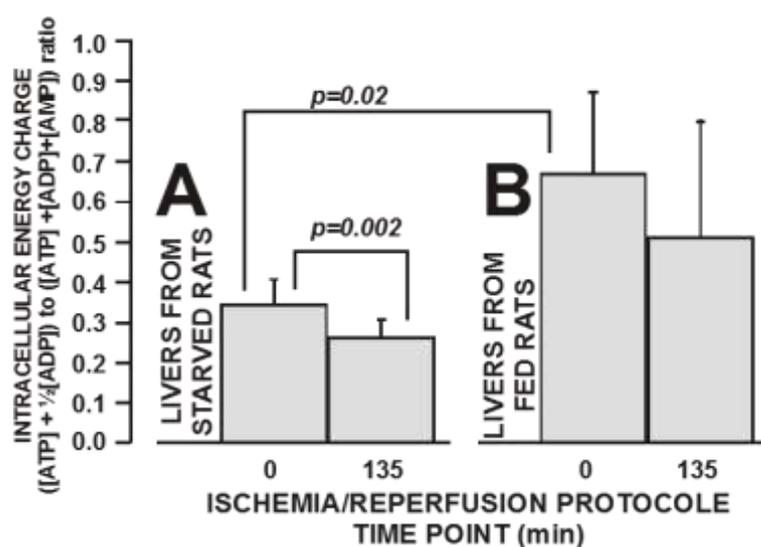
**Tableau 6.1.2.** Évolution de la teneur en glycogène hépatique, exprimée en pourcentage (%), dans les deux groupes au temps zéro et à la fin de l'expérience.

	Intracellular content		P-value (fed vs starved states)
	Origins of perfused <i>ex-vivo</i> livers		
	Fed rats	Starved rats	
Glycogen 0 min	55.5 ± 22.2	10.8 ± 7.6	< 0.01
Glycogen 135 min	52.7 ± 27.6	5.2 ± 2.7 *	< 0.01

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 10 dans chaque groupe). \*p < 0,05 entre 135 et 0 min chez les rats à jeun 18h.

### Nucléotides d'adénosine

L'ATP, l'ADP et l'AMP ont été séparés et détectés à 254 nm selon la procédure HPLC décrite dans la section expérimentale. La **figure 6.1.3** met en évidence les charges d'énergie hépatique calculées à partir de ces déterminations de nucléotides sous la forme des rapports  $([ATP] + \frac{1}{2} [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$  dans (A) les animaux à jeun 18h et (B) les animaux nourris au début et à la fin de l'expérience. Les charges énergétiques et les niveaux d'ATP correspondants étaient plus faibles chez les rats à jeun 18h par rapport au groupe nourri au début de l'expérience (P = 0,02) et ont diminué de manière significative à la fin de la reperfusion dans le groupe à jeun (P = 0,002).



**Fig. 6.1.3.** Valeurs d'histogramme pour les charges énergétiques définies comme des rapports entre les concentrations  $[ATP] + \frac{1}{2} [ADP]$  et les concentrations  $[ATP] + [ADP] + [AMP]$ . Ces valeurs ont été calculées au début et à la fin de l'expérience dans les 2 conditions expérimentales : nourri et à jeun 18h. Le nombre n de foies était de 10 dans chaque groupe expérimental.

### Discussion

Cette étude indique clairement que les foies perfusés *ex-vivo* de rats nourris sont associés à une libération plus faible de protéines intracellulaires et de potassium dans le perfusé que les foies de rats à jeun 18h. Cela signifie que dans ces circonstances, l'état nourri et non pas un jeûne de courte durée protège contre la cytolysse. L'effet protecteur de l'alimentation pourrait s'expliquer par une meilleure disponibilité de substrats énergétiques tels que le glycogène ou d'autres composés glyco-géniques. Le glycogène est essentiel pour maintenir l'intégrité cellulaire en fournissant du glucose pour la génération d'ATP. L'ATP est un élément de départ dans la synthèse des acides nucléiques et participe à la régulation de nombreux processus métaboliques. La principale fonction de l'ATP dans l'organisme est de fournir de l'énergie pour de nombreuses réactions biochimiques et pour les activités de pompe à ions. Il est bien connu que le niveau d'énergie d'une cellule dépend de l'équilibre entre les phosphates d'adénosine, l'ATP, l'ADP et l'AMP [40]. Pour cette raison, le tonus énergétique des cellules a été évalué par la charge énergétique cellulaire calculée comme le rapport entre d'une part, une somme de la concentration d'ATP et la moitié de la concentration d'ADP, et d'autre part, les concentrations de nucléotides adényliques mesurées comme la somme des concentrations d'ATP, d'ADP et

d'AMP. La protection fournie par l'alimentation dans notre modèle a été indiquée par une libération plus faible de marqueurs de cytolysse dans le milieu extracellulaire et a été associée à des niveaux accrus de réserves d'énergie mobilisables rapidement (ATP) et moins rapidement (glycogène).

Les résultats de la présente expérience confirment que l'état nutritionnel est un déterminant important de l'ampleur de la détérioration du foie du rat lors d'un phénomène d'ischémie-reperfusion. Pour atteindre le but de cette étude, nous avons utilisé un organe perfusé *ex-vivo* pour étudier les différents mécanismes des lésions cellulaires hépatiques. Notre étude a démontré que 60 minutes d'absence de flux (anoxie) produisaient des lésions des hépatocytes. Dans les conditions expérimentales actuelles, c'est-à-dire une ischémie de 60 minutes, l'alimentation a un effet protecteur comme le suggère le plus faible flux d'enzymes (AST, ALT et LDH), de potassium et de cytochrome c dans le perfusé pendant la phase de réoxygénation. Ces mesures ont été utilisées précédemment comme indicateurs de dommages hépatocellulaires [20,35,41].

Nos conclusions mettant en évidence la protection par l'alimentation et l'absence de protection par un jeûne court peuvent contraster avec d'autres conclusions, notamment celles obtenues avec la restriction alimentaire sur les lésions ischémiques du foie [14]. Le contraste entre l'alimentation (notre travail) et le jeûne court [14] comme état nutritionnel protecteur peut avoir plusieurs explications entre autres, par des différences dans les modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion hépatique sur lesquels les effets de l'alimentation et du jeûne court sont évalués. Dans le modèle actuel, le foie a été retiré de l'organisme, devenant ainsi non alimenté par des métabolites et des médiateurs d'origine extra-hépatique. Dans les modèles où la restriction alimentaire montre un effet bénéfique, le foie reste connecté à l'organisme et l'ischémie-reperfusion affecte la majeure partie mais pas toutes les parties du foie [14]. Ce foie *in situ* garde un contact complet avec les autres organes dans les phases de perfusion du protocole d'ischémie-reperfusion (avant et après l'ischémie) et maintient ainsi un approvisionnement en substrats énergétiques et en médiateurs d'origine extra-hépatique. Notre modèle, moins physiologique, déconnecte le foie des substrats énergétiques d'origine extra-hépatique comme par exemple les acides gras circulants connus pour alimenter le foie affamé dans des conditions physiologiques. Ce phénomène ainsi que le fait que le glucose présent dans le perfusé est un mauvais substrat pour le métabolisme hépatique (voir ci-dessous dans le texte) pourraient jouer un rôle dans la gestion des réserves d'énergie. Dans le modèle hépatique *in situ*, les niveaux d'ATP à jeun par rapport à l'état d'alimentation sont réduits de moitié après 1 jour [14], ce qui est en accord avec la réduction de moitié de la charge énergétique cellulaire observée dans notre modèle pour les animaux à jeun pendant une période de 18 heures (voir Fig. 6.1.3, A par rapport à B au point zéro). Néanmoins, alors que dans des conditions similaires de jeûne, le foie *in situ* de rat à jeun (vs nourri) est protégé contre l'ischémie-reperfusion avec des quantités réduites de marqueurs de cytolysse (ASL et ALT) libérés dans le sang [14], le foie *ex-vivo* de rat à jeun 18h est plus sensible à l'ischémie-reperfusion avec une libération plus importante de marqueurs de cytolysse que les foies de rats nourris. Dans notre modèle, les foies *ex-vivo* de rats à jeun ont montré des différences significatives dans les charges énergétiques des cellules avant et après l'ischémie-reperfusion ( $P < 0,002$ , Fig. 6.1.3). Ces charges énergétiques étaient supérieures et inférieures à 0,3 aux points temporels de 0 et 135 min, respectivement (Fig. 6.1.3). Cette valeur pourrait être proche d'un seuil de disponibilité énergétique à dépasser pour assurer la protection, comme si la signalisation protectrice sous-jacente et les effets à médiation cellulaire nécessitaient un minimum d'énergie pour se développer. Ce point de vue ne signifie pas que les charges énergétiques supérieures à cette valeur sont protectrices par elles-mêmes. À cet égard, les travaux antérieurs sur le foie *in situ* avaient bien précisé que des valeurs d'ATP substantielles n'étaient pas nécessaires pour offrir une protection, les deux, les valeurs d'ATP élevées et la protection, étant dissociables [14].

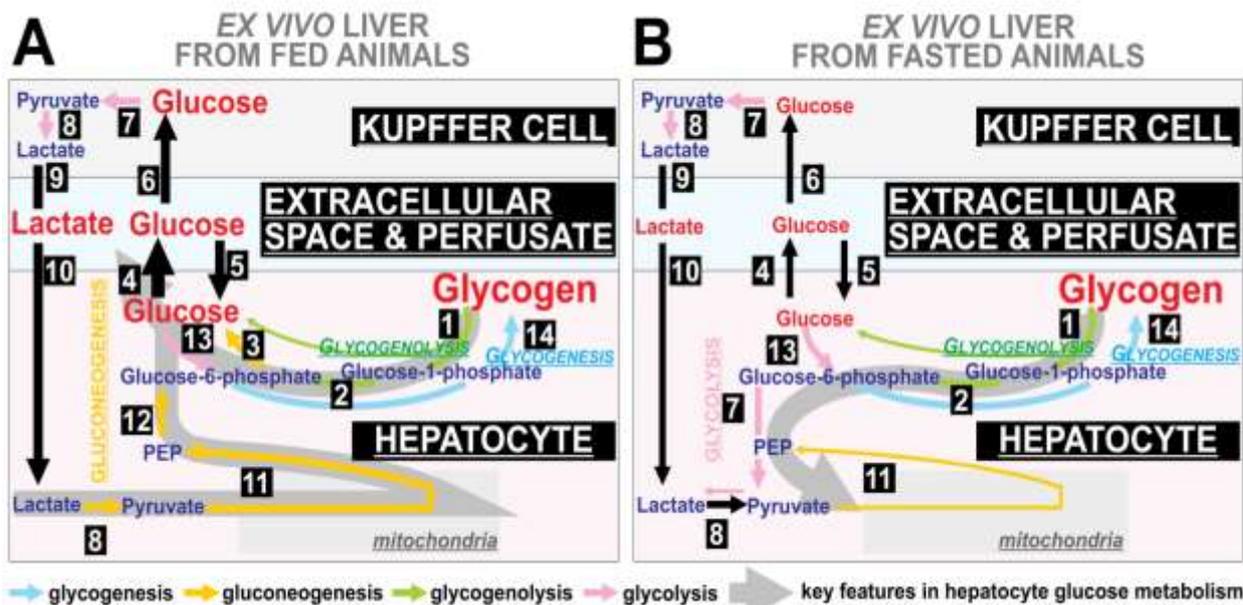
D'autre part, ce point de vue pour un besoin énergétique minimal ne remet pas en cause la protection omniprésente classiquement rapportée pour la restriction alimentaire dans les modèles bien établis. De plus, cela pourrait expliquer pourquoi, en la matière, la malnutrition, contrairement à la restriction alimentaire, ne véhicule pas de mécanismes de protection classiques.

Des études antérieures utilisant des foies perfusés ont montré que l'absorption de glucose est très faible [42-45]. Chez le rat, il est prouvé que la capacité d'utilisation du glucose est limitée et que le dépôt de glycogène dans le foie est principalement un processus gluconéogénique [46]. D'autre part, la libération de glucose est un indicateur de la présence de réserves de glycogène dans le foie des rats nourris [47]. À cet égard, les foies *ex-vivo* de rats nourris ont une plus grande libération de glucose pendant les 15 premières minutes de la présente expérience. De plus grandes quantités de lactate générées à l'état nourri sont susceptibles de refléter une glycolyse anaérobie et, fait intéressant, sont parallèles à la plus grande libération de glucose de la glycogénolyse. Une teneur plus élevée en glycogène hépatique pourrait contribuer à la résistance accrue des foies des rats nourris aux lésions ischémiques par rapport à ceux des rats à jeun. Les mécanismes sous-jacents pourraient être la formation soutenue d'ATP glycolytique ou, du moins, le fait d'éviter de descendre en dessous d'une charge énergétique minimale. Néanmoins, malgré une teneur

en glycogène plus faible, les foies à jeun ont apparemment montré une dégradation du glycogène nettement plus importante qu'à l'état nourri, ce qui suggère que le glycogène est utilisé comme substrat énergétique lors de la reperfusion. Cependant, la teneur en glycogène est une conséquence de la glycogénèse et de la glycogénolyse, une autre interprétation des différences de variations de la teneur en glycogène observées au cours des expériences pourrait tenir à une glycogénèse plus élevée à l'état nourri. À cet égard, la glycogénisation du foie a déjà été signalée comme étant bénéfique pour la protection du foie [48,49].

La glycogénolyse du foie est physiologiquement couplée à la gluconéogenèse pour fournir du glucose aux tissus extra-hépatiques. L'oxydation extra-hépatique du glucose par la glycolyse anaérobie génère du pyruvate et donc ses métabolites, le lactate et l'alanine, qui sont tous deux envoyés au foie par le cycle de Cori (une voie métabolique coopérative muscle-foie également appelée cycle de l'acide lactique) pour être dirigés vers la gluconéogenèse hépatique et ré-alimenter les tissus extra-hépatiques en glucose [50-52]. Lorsque la pression partielle d'oxygène chute, les tissus effectuent une glycolyse anaérobie, produisant de l'acide lactique. Dans le cas du foie, il a également été démontré que les conditions anoxiques/hypoxiques favorisent la gluconéogenèse hépatique et la production de glucose par la régulation positive de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), l'étape limitant le taux de gluconéogenèse hépatique, médiée par HIF-1 et ATF-2 [53]. Par conséquent, en ce qui concerne le foie *ex-vivo*, on pourrait proposer qu'un cycle d'acide lactique ait lieu entre les hépatocytes (un site de la gluconéogenèse du foie et de l'efflux de glucose) et les cellules Kupffer, un site connu de glycolyse et d'absorption de glucose. En effet, les cellules de Kupffer, qui peuvent être ontogéniquement apparentées aux lymphocytes, sont capables de présenter des taux de glycolyse élevés [54], ce qui, de façon intéressante pour le présent travail, peut même permettre de résoudre un problème salubre en assurant la synthèse de l'ATP dans des conditions anoxiques [55]. Dans cette interaction probable entre les hépatocytes et les cellules Kupffer, illustrée pour le foie *ex-vivo* d'animaux nourris à la **figure 6.1.4**, panneau A, la dégradation du glycogène génère de grandes quantités de glucose libérées dans l'espace extracellulaire/perfusat. La libération ultérieure de lactate est expliquée par la glycolyse anaérobie des cellules de Kupffer. En raison de l'exposition de ces dernières cellules à des quantités élevées de glucose, des quantités substantielles de lactate peuvent être libérées dans le perfusat par ces cellules. Une partie de ce lactate peut être réabsorbée par les hépatocytes pour servir de source d'énergie ou à des fins gluconéogéniques.

La gluconéogenèse induit un coût énergétique élevé. Par conséquent, lorsque la disponibilité de l'énergie est perturbée pendant la phase de reperfusion, la combinaison de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse peut être compromise par une chute profonde de la gluconéogenèse due à une faible charge énergétique (par exemple en dessous de la valeur seuil de 0,3 comme indiqué par nos travaux). Il est intéressant de noter que cette situation pourrait bénéficier d'un changement métabolique dans lequel la glycogénolyse du foie, au lieu d'être combinée avec la gluconéogenèse (non productrice d'ATP pour l'hépatocyte), serait remplacée par une glycogénolyse couplée à la glycolyse (productrice d'ATP pour l'hépatocyte). Dans ce métabolisme décalé illustré pour le foie *ex-vivo* d'animaux à jeun dans la **figure 6.1.4** (panneau B), peu de glucose est généré à partir du glycogène et donc disponible pour les cellules Kupffer, ce qui conduit à une faible production et libération de lactate dans le perfusat. La glycogénèse à partir des précurseurs extracellulaires de glucose et de lactate est par conséquent réduite et ne compense pas la glycogénolyse, ce qui explique pourquoi la déplétion du glycogène dans le foie à jeun est plus importante.



**Fig. 6.1.4.** Principales caractéristiques métaboliques proposées pour expliquer les différences observées dans les teneurs en glycogène des hépatocytes et les rejets de lactate pendant la phase de reperfusion entre les foies *ex-vivo* perfusés d'animaux nourris (A) et à jeun (B). Le changement métabolique des foies à jeun et tous les autres événements métaboliques décrits sont commentés dans le texte (section Discussion).

La numérotation des étapes métaboliques est la suivante : 1, glycogène phosphorylase et enzyme de déramification ; 2, phosphoglucomutase ; 3, glucose-6-phosphatase ; 4, GLUT2 (transporteur de glucose 2) et/ou mécanismes d'efflux à médiation vésiculaire ; 5, GLUT2 ; 6, GLUT1 (transporteur de glucose 1) ; 7, glycolyse ; 8, lactate déshydrogénase ; 9, efflux de lactate des transporteurs de monocarboxylates (MCT) ; 10, transporteur de monocarboxylates 2 (MCT2) ; 11, transporteur de pyruvate mitochondrial, pyruvate carboxylase et phosphoénolpyruvate carboxykinase ; 12, gluconéogenèse ; 13, glucokinase/hexokinase ; 14, UDP-glucose pyrophosphorylase, glycogénine, glycogène synthase et enzyme de ramification.

## Conclusion

La présente étude réalisée sur des foies *ex-vivo* de rats nourris et à jeun 18h permet, de par sa déconnection de l'organisme et son aspect moins physiologique comparé aux modèles de foie *in situ*, d'exploiter les différences observées dans les sensibilités des modèles *ex-vivo* et *in situ* à l'état nutritionnel pendant l'ischémie-reperfusion. Le contraste existant entre l'alimentation et le jeûne en tant que mécanismes de protection contre l'ischémie-reperfusion dans le foie *ex-vivo* et *in situ*, respectivement, conduit à proposer qu'un besoin énergétique minimal puisse avoir lieu pour permettre la protection. Plus particulièrement, le dépassement de la valeur seuil de charge énergétique de 0,3 pourrait déterminer l'efficacité des mécanismes de protection.

## Bibliographie

- (1) Amigo I, Kowaltowski AJ. Dietary restriction in cerebral bioenergetics and redox state. *Redox Biol* 2014; 2:296-304.
- (2) Dacks PA, Moreno CL, Kim ES, Marcellino BK, Mobbs CV. Role of the hypothalamus in mediating protective effects of dietary restriction during aging. *Front Neuroendocrinol* 2013; 34:95-106.
- (3) Pani G. Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40:106-14.
- (4) Robertson LT, Mitchell JR. Benefits of short-term dietary restriction in mammals. *Exp Gerontol* 2013; 48:1043-8.
- (5) Ruetenik A, Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1847:1434-47.
- (6) Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des* 2014; 20:2950-77.
- (7) Yu ZF, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: Evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* 1999; 57:830-9.
- (8) Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 2005; 112:3115-21.
- (9) Chandrasekar B, Nelson JF, Colston JT, Freeman GL. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2094-102.
- (10) Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Impact of 6-months caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: Possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295:H2348-55.
- (11) Shinmura K, Tamaki K, Saito K, Nakano Y, Tobe T, Bolli R. Cardioprotective effects of short term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 2007; 116:2809-17.
- (12) Mitchell JR, Verweij M, Brand K, van de Ven M, Goemaere N, van den Engel S, et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* 2010; 9:40-53.
- (13) Shushimita S, van der Pol P, de Bruin RWF, Ijzermans JNM, van Kooten C, Dor FJ. Binding Lectin Is Involved in the Protection against Renal Ischemia/Reperfusion Injury by Dietary Restriction. *PLoS One* 2015;10: e0137795.
- (14) Rickenbacher A, Jang JH, Limani P, Ungethüm U, Lehmann K, Oberkofler CE, et al. Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice. *J Hepatol* 2014; 61:301-8.
- (15) Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstuhl C, Lee BC, Brace L, et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 2015; 160:132-44.
- (16) Hine C, Mitchell JR. Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. *Experimental Gerontology* 2015; 68:26-32.
- (17) Shim HS, Longo VD. A Protein Restriction-Dependent Sulfur Code for Longevity. *Cell* 2015; 160:15-7.
- (18) Lo Faro ML, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide* 2014; 41:38-47.
- (19) Mani S, Cao W, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide and the liver. *Nitric Oxide* 2014; 41:62-71. 13.
- (20) Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology* 2005; 103:978-86.
- (21) Latchana N, Peck JR, Whitson BA, Henry ML, Elkhammas EA, Black SM. Preservation solutions used during abdominal transplantation: Current status and outcomes. *World J Transplant* 2015; 5:154-64.
- (22) D'Allessandro AM, Hoffmann RM, Southard JH. Solution Development in Organ Preservation: The University of Wisconsin Perspective. *Transplant Rev* 1999; 13:67-77.
- (23) Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Machine perfusion preservation of the non-heart-beating donor rat livers using polysol, a new preservation solution. *Transplant Proc* 2005; 37:326-8.
- (24) Southard JH, Pienaar H, McAnulty JF, D'Allessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, Kalayoglu M, Sollinger HW, Belzer FO. The University of Wisconsin solution for organ preservation. *Transplant Rev* 1989; 3:103-30.
- (25) Bell R, Shiel AG, Dolan P, Mears DC, Woodman K. The evaluation of the isolated perfused liver as a model for the assessment of liver preservation. *Aust N Z J Surg* 1993; 63:44-52.
- (26) Hong JC, Venick R, Yersiz H, Kositamongkol P, Kaldas FM, Petrowsky H, Farmer DG, Agopian V, McDiarmid SV, Hiatt JR, Busuttil RW. Liver transplantation in children using organ donation after circulatory death: a case-control outcomes analysis of a 20-year experience in a single center. *JAMA Surg* 2014; 149:77-82
- (27) Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989; 261:711-4.

- (28) Ceriello A, Novials A, Canivell S, La Sala L, Pujadas G, Esposito K, Testa R, Bucciarelli L, Rondinelli M, Genovese S. Simultaneous GLP-1 and insulin administration acutely enhances their vasodilatory, antiinflammatory, and antioxidant action in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37:1938-43.
- (29) Dandona P, Mohanty P, Chaudhuri A, Garg R, Aljada A. Insulin infusion in acute illness. *J Clin Invest* 2005; 115:2069-72.
- (30) Galland F, Duvillard L, Petit JM, Lagrost L, Vaillant G, Brun JM, Gambert P, Vergès B. Effect of insulin treatment on plasma oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006; 32:625-31.
- (31) Owens DR. Clinical evidence for the earlier initiation of insulin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2013; 15:776-85.
- (32) Shilling AM, Raphael J. Diabetes, hyperglycemia, and infections. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2008; 22:519-35.
- (33) Wang X, Wu H, Chen H, Liu R, Liu J, Zhang T, Yu W, Hai C. Does insulin bolster antioxidant defenses via the extracellular signal-regulated kinases-protein kinase B-nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 pathway? *Antioxid Redox Signal* 2012; 16:1061-70.
- (34) Wayhs CA, Mescka CP, Guerreiro G, Moraes TB, Jacques CE, Rosa AP, Ferri MK, Nin MS, Dutra-Filho CS, Barros HM, Vargas CR. Diabetic encephalopathy-related depression: experimental evidence that insulin and clonazepam restore antioxidant status in rat brain. *Cell Biochem Funct* 2014; 32:711-9.
- (35) Stadler M, Nuyens V, Boogaerts JG. Intralipid minimizes hepatocytes injury after anoxia-reoxygenation in an ex vivo rat liver model. *Nutrition* 2007; 23:53-61.
- (36) Sato S. Ultrastructural and morphometric studies of normal rat hepatocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004; 36:131-40.
- (37) Wynants J, Belle H. Single-run high-performance liquid chromatography of nucleotides, nucleosides, and major purine bases and its application to different tissue extracts. *Anal Biochem* 1985; 144:258-66.
- (38) Khlyntseva SV, Bazel YaR, Visnikin AB, Andruch V. Methods of the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *J Anal Chem* 2009; 64:657-73.
- (39) Zerbe GO. Randomization analysis of the completely randomized design extended to growth and response curves. *J Am Stat Assoc* 1979; 74:215-21. 14
- (40) Metzler D. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. New York: Academic, Vol 1. (1977)
- (41) Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 1986; 6:511-7.
- (42) Boyd ME, Albright EB, Foster DW, McGarry JD. In vitro reversal of the fasting state of liver metabolism in the rat. Reevaluation of the roles of insulin and glucose. *J Clin Invest* 1981; 68:142-52.
- (43) Huang MT, Veech RL. Role of the direct and indirect pathways for glycogen synthesis in rat liver in the postprandial state. *J Clin Invest* 1988; 81:872-8.
- (44) Plauth M, Zimmermann B, Raible A, Vieillard-Baron D, Bauder-Gross D, Hartmann F. Use of an artificial oxygen carrier in isolated rat liver perfusion: first demonstration of net glucose uptake at physiological portal glucose concentrations using a hemoglobin-free perfusate. *Res Exp Med (Berl)* 1991; 191:339-47.
- (45) Storer GB, Topping DL, Trimble RP. Direct stimulation by glucose and insulin of glycogen synthesis in perfused rat liver. *FEBS Lett* 1981; 136:135-7.
- (46) Katz J, Mc Garry JD. The glucose paradox: Is glucose a substrate for liver metabolism? *J Clin Invest* 1984; 74:1901-9.
- (47) Hems DA, Whitton PD. Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol Rev* 1980; 60:1-50.
- (48) Cywes R, Greig PD, Sanabria JR, Clavien PA, Levy GA, Harvey PR, et al. Effect of intraportal glucose infusion on hepatic glycogen content and degradation, and outcome of liver transplantation. *Ann Surg* 1992; 216:235-46.
- (49) Cywes R, Greig PD, Morgan GR, Sanabria JR, Clavien PA, Harvey PR, et al. Rapid donor liver nutritional enhancement in a large animal model. *Hepatology* 1992; 16:1271-9.
- (50) Cori CF. The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. *Curr Top Cell Regul* 1981; 18:377-87.
- (51) Felig P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism* 1973; 22:179-207.
- (52) Katz J, Tayek JA. Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12, 20 and 40 h –fasted humans. *Am J Physiol* 1998; 275(Endocrinol Metab 38): E537-42.
- (53) Choi JH, Park MJ, Kim KW, Choi YH, Park SH, An WG, et al. Molecular mechanism of hypoxia-mediated hepatic gluconeogenesis by transcriptional regulation. *FEBS Lett* 2005; 579:2795-801.
- (54) Stark H, Fichtner M, König R, Lorkowski S, Schuster S. Causes of upregulation of glycolysis in lymphocytes upon stimulation. A comparison with other cell types. *Biochimie* 2015; 118:185-94.
- (55) Oh KW, Currin RT, Lemasters JJ. Kupffer cells mediate increased anoxic hepatocellular killing from hyperosmolarity by an oxygen- and prostaglandin-independent mechanism. *Toxicol Lett* 2000;117:95-100.

## **6.2. Rôle protecteur des substrats énergétiques : Lactate et Alanine**

Les deux travaux repris ici, l'un doctoral et l'autre pré-doctoral, montrent qu'une hépatoprotection du foie isolé peut être obtenue par un apport énergétique *via* la perfusion du foie isolé

### **6.2.1. 2<sup>ème</sup> article publié : Amélioration de la charge énergétique et protection du foie de rat par l'administration de L-Lactate.**

#### **Résumé**

Bien que la restriction alimentaire ait prouvé son efficacité dans la protection contre les lésions de différents organes, il est également prouvé que la mise en danger de la charge énergétique peut être préjudiciable. Le foie joue un rôle énergétique particulier dans la régulation de la glycémie entre les repas. À cette fin, le foie produit du glucose par la gluconéogenèse à partir de précurseurs métaboliques, dont certains peuvent également être oxydés par les mitochondries des cellules hépatiques. C'est le cas de l'oxaloacétate (OAA), un substrat à la fois de la gluconéogenèse et de l'oxydation du cycle de Krebs mitochondrial, et qui, dans un numéro récent de *Liver Transplantation*, a montré qu'il protégeait le foie et la charge énergétique des rats lors des phénomènes d'ischémie chaude-reperfusion. Nous documentons ici la protection expérimentale liée à l'administration de lactate dans un modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo* et son effet sur la charge énergétique.

**Conclusion** : Le foie peut être protégé par des métabolites hépatiques à double vocation, substrats à la fois de la gluconéogenèse (coûteuse en énergie) et des voies mitochondriales de production d'énergie. La protection du foie semble être associée à la préservation/au gain de la charge énergétique, ce qui suggère, comme mécanisme de protection énergétique, la prépondérance des oxydations mitochondriales des hépatocytes sur la gluconéogenèse dans le traitement des métabolites à double action, l'OAA et le lactate. La discussion sur les principaux déterminants qui orientent leur métabolisme vers des oxydations productrices d'énergie (par opposition à la gluconéogenèse) pourrait indiquer de nouvelles stratégies de préservation/protection du foie.

#### **Introduction**

Récemment, Merlen et al. [1] ont démontré la protection, par l'oxaloacétate (OAA), du foie de rat contre les lésions dues à l'ischémie chaude/la reperfusion. À cette occasion, l'amélioration du métabolisme énergétique et de la charge énergétique a été corrélée à la protection observée. Nos expériences utilisant le lactate (L-lactate de sodium) concluent également que la protection du foie et l'amélioration de la charge énergétique sont également associées dans un modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo* isolé de rats privés de nourriture pendant 18 heures et soumis à une ischémie/reperfusion froide de 24 heures. Notre observation expérimentale peut compléter celles de Merlen et al. [1], en attirant l'attention sur l'OAA et le lactate en tant que composés à double action pour le métabolisme hépatique en raison de leur capacité à s'engager à la fois dans la gluconéogenèse, coûteuse en énergie, et dans les oxydations mitochondriales productrices d'énergie. Étant donné que la première et la seconde voie métabolique peuvent conduire respectivement à la déplétion et à la réplétion de l'état énergétique des hépatocytes, la préservation/le gain de la charge énergétique peut attester de la prépondérance de la seconde voie métabolique sur la première. En gardant à l'esprit que l'OAA et le lactate sont dotés de nombreux autres effets cellulaires, la discussion portera sur les aspects énergétiques de l'exposition du foie à ces métabolites.

#### **Matériels et méthodes**

Les rats ont été achetés, acclimatés, nourris et soignés dans des installations de recherche sur les animaux comme décrit [2]. La nourriture a été retirée 18 heures avant l'isolement du foie avec maintien d'un accès à l'eau. Le foie a été perfusé *ex-vivo* avec une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) modifiée sans albumine, [2] incluant 1,8 mM de sodium-L-lactate (Aguettant, Lyon, France) pour les foies perfusés au lactate. Les perfusions ont été ajustées à un pH de  $7,35 \pm 0,05$  en utilisant du NaOH 1 M et complétées avec du NaCl pour obtenir 300 mOsm, [2] en minimisant les différences de charge en sodium entre les deux groupes de foie ( $n = 9$  dans chaque groupe) : un groupe contrôle à

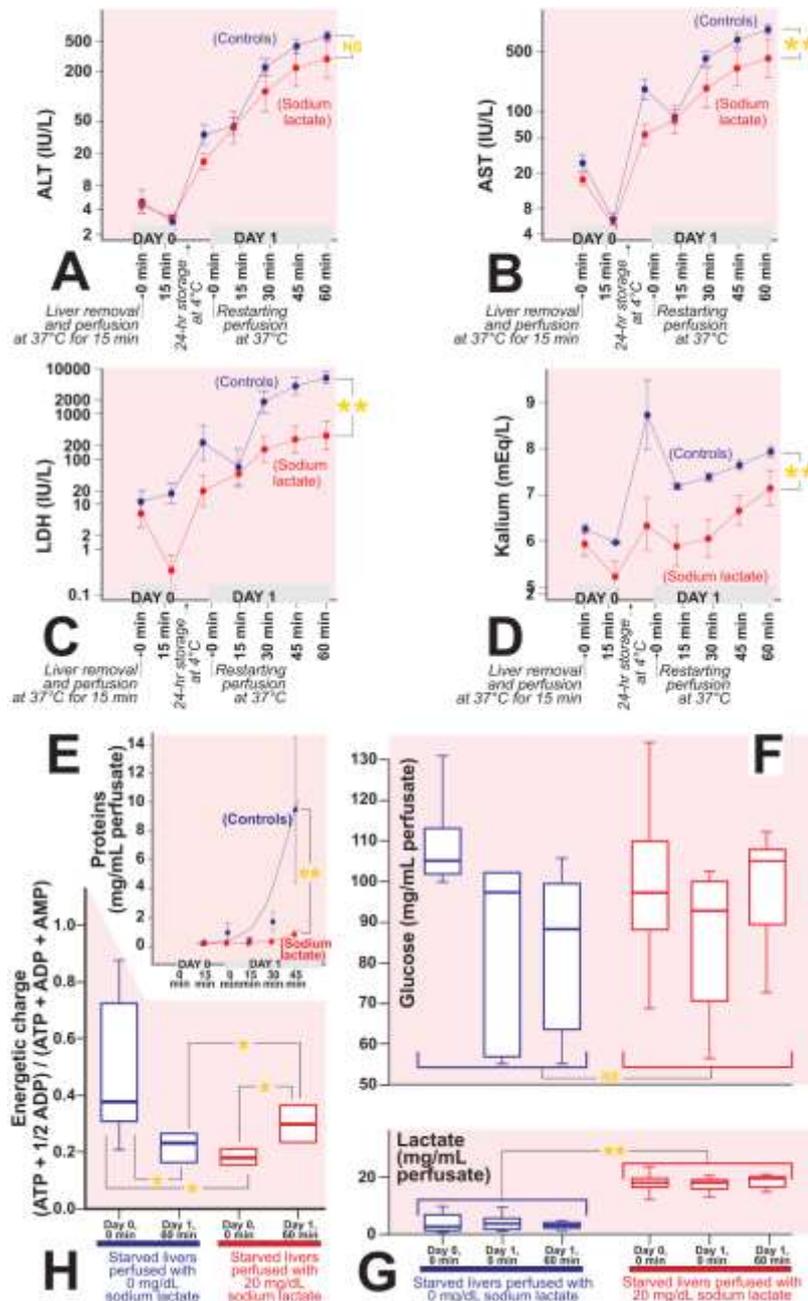
jeun 18h sans lactate et un groupe à jeun 18h perfusé avec du L-lactate de sodium. Le protocole d'ischémie froide 24h/reperfusion s'est déroulé en trois temps : perfusion du foie pendant 15 minutes à 37°C à partir de l'extraction du foie (jour 0, 0 minutes) ; arrêt de la perfusion avec conservation du foie à 4°C pendant 24 heures dans le perfusat ; et reperfusion à 37°C pendant 60 minutes. À différents temps, des échantillons de 1 ml ont été prélevés dans les perfusats pour déterminer le dosage de l'alanine aminotransférase (ALT ; IU/L), l'aspartate aminotransférase (AST ; IU/L), la lactate déshydrogénase (LDH ; IU/L), le glucose (mg/mL), le lactate (mg/mL) et le potassium (mEq/L) libérés, comme décrit [2], et les protéines totales par la méthode Bradford. Les phosphates d'adénosine ont été dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur des biopsies du foie, et les charges énergétiques ont été calculées sous forme de rapports  $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  [2]. Les résultats biologiques ont été illustrés en moyenne et des écart-type (SD) ou des représentations classiques en Boxplot, et la comparaison des données de groupe a été effectuée par le test de Kruskal-Wallis [2]. Cette étude a reçu l'approbation du Comité de protection des animaux de l'Université Libre de Bruxelles (CEBEA-IBMM-2014-39).

## Résultats

Comme l'illustre la **figure 6.2.1.1**, l'inclusion de lactate dans le perfusat a réduit de manière significative la libération de toutes les enzymes sauf une, le potassium et les protéines totales dans le perfusat après une ischémie froide de 24 heures/reperfusion de foies isolés de rats privés de nourriture depuis 18 heures. Comme le montre également la figure, la surveillance du glucose et du lactate dans les perfusats hépatiques n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives dans les concentrations de glucose entre les groupes de foie dépourvus de lactate et les groupes de foie perfusés avec du lactate, alors que les concentrations de lactate, après son inclusion dans la perfusion, étaient significativement plus élevées dans le groupe supplémenté. En outre, la charge énergétique dans les foies *ex-vivo* perfusés par du lactate, qui était significativement plus faible avant la lésion (au jour 0, point 0 minute), est devenue significativement plus élevée après une ischémie froide 24h froide/reperfusion (au jour 1, point 60 minutes).

## Discussion

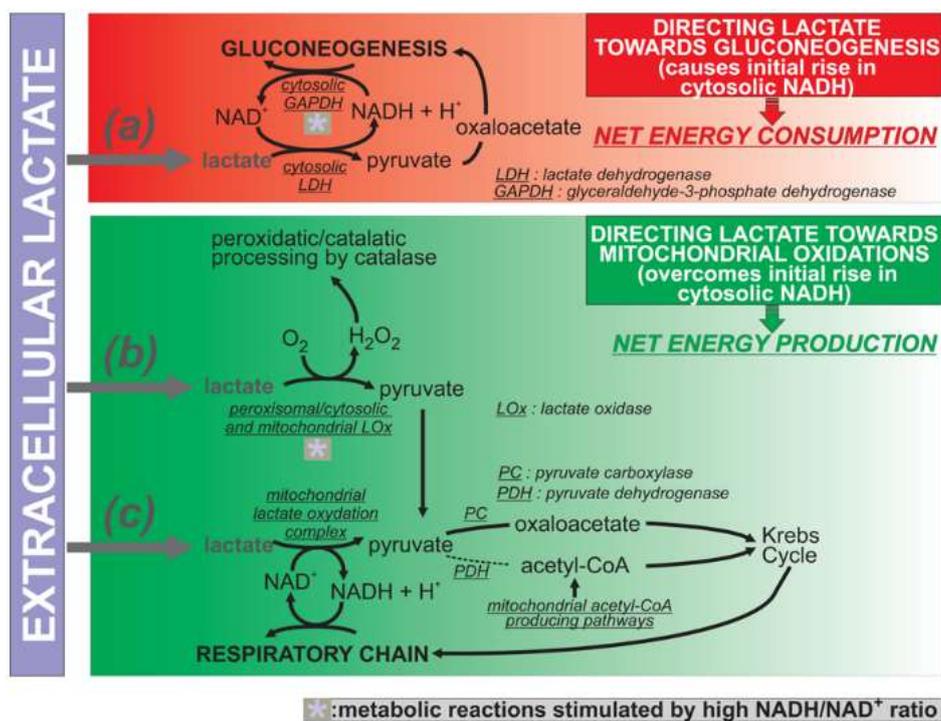
Les données actuelles soutiennent la protection, par le lactate, des foies isolés de rats à jeun 18h (diminution des enzymes marqueurs de la cytolysse et des protéines totales dans les perfusats hépatiques). La protection englobe également la charge énergétique des cellules. Bien que cette dernière ne soit qu'une des facettes de l'état énergétique des cellules, son amélioration suggère que le lactate n'était pas entièrement engagé dans la gluconéogenèse et agissait comme un substrat contribuant à l'homéostasie énergétique, soulignant pour le foie le rôle énergétique du lactate déjà connu pour d'autres organes, notamment le cœur, le cerveau et le muscle. La baisse initiale de la charge énergétique due au lactate (**Fig. 6.2.1.1H**) pourrait refléter son utilisation initiale par la gluconéogenèse avec consommation d'énergie. Néanmoins, le lactate contribue finalement à l'amélioration de la charge énergétique des hépatocytes (**Fig. 6.2.1.1H**). La conversion du lactate en pyruvate par la LDH cytosolique induit une augmentation de la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), ce qui est favorable pour diriger l'activité de la *glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* vers la gluconéogenèse. Le pyruvate peut être carboxylé dans les mitochondries par la *pyruvate carboxylase* en OAA, qui peut alimenter, par le phosphoénolpyruvate, la gluconéogenèse sous taux élevé de NADH.



**Fig.6.2.1.1.** Effet sur les lésions d'ischémie froide 24h/reperfusion de l'inclusion de lactate dans la perfusion de foies *ex-vivo* isolés de rats à jeun 18 heures. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  SD et sont exprimés en échelle logarithmique (ALT, AST et LDH) et décimale (pour les autres paramètres) des valeurs ordonnées. Les données sur les perfusats hépatiques (A-F) et les tissus (G, H) sont développées dans le texte principal. Les éléments ouverts et fermés (cercles, cases) font référence à la privation et à la supplémentation en lactate, respectivement. Abréviations et symboles : ALT, alanine aminotransférase ; AST, aspartate aminotransférase ; h, heure ; LDH, lactate déshydrogénase ; min, minute ; NS, non significatif, \* ,  $P < .05$  ; \*\* ,  $P < .01$ .

La baisse initiale de la charge énergétique induite par l'administration de lactate (au jour 0, 0 minutes) pourrait attester de cette augmentation immédiate du NADH cytosolique et de la stimulation de la voie de la gluconéogenèse, coûteuse en énergie. Cependant, la charge énergétique est améliorée par le lactate (par rapport aux témoins) après ischémie froide/reperfusion, ce qui indique un shift du lactate vers les voies d'oxydation et la production d'énergie. Le lactate est un précurseur de l'OAA, et ses propriétés protectrices pourraient donc être attribuées à celles de l'OAA. [1] Il est intéressant de noter que, contrairement au lactate, la charge du cytosol par l'OAA ne peut pas induire l'augmentation du NADH (l'OAA diminue la quantité de NADH par la réaction de la *malate déshydrogénase cytosolique*). Cette absence d'augmentation du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> cytoplasmique pourrait empêcher la gluconéogenèse de se poursuivre, rendant l'OAA disponible pour l'oxydation du cycle de Krebs mitochondrial comme décrit [1]. Par analogie, le passage du lactate aux oxydations mitochondriales par rapport à la gluconéogenèse pourrait également nécessiter la chute du NADH cytosolique. Ceci pourrait être réalisé par le complexe d'oxydation mitochondrial du lactate, qui couple directement la production de NADH dépendant du lactate à la chaîne d'électrons mitochondriale [3], et non à la gluconéogenèse. Une réaction intéressante, mais négligée, est celle de la *lactate*

*oxydase* du foie de rat. Il a été démontré que cette activité enzymatique, qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate avec production  $H_2O_2$  au lieu de la production de NADH, est située dans l'espace intermembranaire mitochondrial et est inhibée par un faible rapport  $NADH/NAD^+$  [4]. Par conséquent, il n'est pas exclu que l'augmentation initiale du NADH provoqué par l'oxydation du lactate atténue l'inhibition de la *lactate oxydase* dépendante du  $NAD^+$ . Le relais de l'oxydation du lactate par cette enzyme n'est pas associé à la production cytoplasmique de NADH ; il pourrait atténuer la gluconéogenèse du lactate, orientant le métabolisme vers les oxydations mitochondriales avec amélioration de la charge énergétique et de la protection du foie. Le lactate pourrait donc faire partie de stratégies de protection/préservation pour les foies de donneurs. L'activité de la *lactate oxydase* pourrait, en agissant comme un capteur d'énergie redox, fournir une explication cohérente du passage observé ici d'une alimentation initiale présumée de la gluconéogenèse par le lactate à l'utilisation finale du lactate par des oxydations hépatiques productrices d'énergie. Cela conduit à une double modulation de l'énergie : l'économie d'énergie par l'évitement de la gluconéogenèse et la production d'énergie par les oxydations mitochondriales. Il est intéressant de noter que les activités peroxysomales et cytosoliques de la *lactate oxydase* du foie de rat ont également été récemment démontrées comme contribuant activement au métabolisme du lactate [5], ce qui a été validé par leur couplage à l'oxydation de l'éthanol par la *catalase* [5]. Ces observations indiquent que les voies d'oxydation du lactate non produit par le NADH cytosolique du foie, sont des cibles potentielles pour la protection du foie par la stratégie de double modulation d'énergie mentionnée ci-dessus. La **figure 6.2.1.2** présente un schéma simple des mécanismes sous-jacents présumés de l'hépatoprotection actuelle par le lactate.



**Fig.6.2.1.2. Aspects énergétiques et redox du métabolisme hépatique du lactate extracellulaire.** Le lactate extracellulaire pénètre dans l'hépatocyte par l'intermédiaire de porteurs de monocarboxylates. Le lactate est utilisé à des fins gluconéogéniques ou énergétiques. La gluconéogenèse est coûteuse en énergie alors que la production énergétique à partir du lactate dépend des oxydations mitochondriales. La conversion du lactate en pyruvate peut être catalysée par : (a) la lactate déshydrogénase cytosolique, (b) la lactate oxydase cytosolique/peroxysomale/mitochondriale, et (c) le système d'oxydation du lactate mitochondrial. La première enzyme catalyse les interconversions réversibles du lactate et du pyruvate avec la production de NADH cytosolique lorsqu'elle oxyde le lactate (a). Les deux dernières enzymes sont décrites pour favoriser l'oxydation unidirectionnelle du lactate en pyruvate avec soit la production de peroxyde d'hydrogène (b), soit la production de NADH alimentant immédiatement la chaîne respiratoire mitochondriale (c). Le gain en charge énergétique observé dans notre modèle de lésion hépatique pourrait témoigner de l'utilisation énergétique du lactate par les oxydations mitochondriales, suggérant l'implication de la lactate oxydase et du complexe d'oxydation mitochondriale du lactate dans le métabolisme hépatique du lactate d'origine extracellulaire.

## **Bibliographie**

- (1) Merlen G, Raymond VA, Cassim S, Lapierre P, Bilodeau M. Oxaloacetate protects rat liver from experimental warm ischemia/ reperfusion injury by improving cellular energy metabolism. *Liver Transpl* 2019; 25:627-639.
- (2) Papegay B, Stadler M, Nuyens V, Kruys V, Boogaerts JG, Vamecq J. Short fasting does not protect perfused ex vivo rat liver against ischemia-reperfusion. On the importance of a minimal cell energy charge. *Nutrition* 2017; 35:21-27.
- (3) Brooks GA. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab* 2018; 27:757-785.
- (4) de Bari L, Valenti D, Atlante A, Passarella S. L-lactate generates hydrogen peroxide in purified rat liver mitochondria due to the putative L-lactate oxidase localized in the intermembrane space. *FEBS Lett* 2010; 584:2285-2290.
- (5) Villalobos-García D, Hernández-Muñoz R. Lactate-stimulated ethanol oxidation: revisiting an old hypothesis. *Biochem Pharmacol* 2019;164:283-288.

## **6.2.2. Article publié en pré-doctorat: L'Alanine minimise les lésions de cytolyse hépatique après ischémie-reperfusion dans un modèle de foie de rat *ex-vivo*.**

### **Résumé**

Les lésions d'ischémie-reperfusion sont un facteur déterminant des lésions hépatiques survenant lors d'une intervention chirurgicale, d'états ischémiques et lors de la défaillance de plusieurs organes. L'état nutritionnel préexistant du foie, c'est-à-dire le jeûne, peut contribuer à l'étendue des lésions tissulaires. Cette étude a pour objectif de déterminer si l'alanine, un acide aminé précurseur du glucose, peut protéger les foies perfusés *ex-vivo* de rats à jeun contre les lésions de reperfusion. Dans ce modèle, la veine porte a été canulée, le foie enlevé et perfusé dans un système *ex-vivo* fermé. Les foies isolés ont été perfusés soit avec du glucose à 1 g/L et 10 g/L, soit avec des concentrations égales d'alanine (n = 10 dans chaque groupe). L'expérience a consisté en une perfusion de 15 minutes, une ischémie chaude de 60 minutes et une réoxygénation de 60 minutes. Les enzymes hépatiques AST, ALT, LDH,  $\gamma$ -glutamyltransférase, phosphatase alcaline et le glucose, le lactate et la bilirubine ont été dosés dans les échantillons de perfusat. La quantité de glycogène ainsi que l'activation de la caspase 3 ont été déterminées dans des biopsies. Nos résultats montrent que l'alanine à une concentration de 10 g/L atténue la libération d'enzymes dans le perfusat pendant la phase de réoxygénation par rapport aux groupes traités au glucose. Le taux de lactate dans le perfusat est le plus faible dans les groupes ayant reçu de l'alanine. L'ischémie-reperfusion et principalement l'alanine activent l'apoptose, spécifiquement dans les cellules de Kupffer et dans les cellules endothéliales. L'alanine présente un effet protecteur sur les lésions normothermiques d'ischémie-reperfusion du foie de rat à jeun, par rapport au glucose.

### **Introduction**

Depuis plus de deux décennies, des études expérimentales ont démontré que les foies d'animaux nourris étaient plus résistants aux lésions ischémiques normothermiques que les foies d'animaux mis à jeun 18h [5,8,12]. Stadler et al. [28] ont montré que les foies de rats d'animaux à jeun exposés à une perfusion prolongée *ex-vivo* ou à des lésions ischémiques normothermiques et de reperfusion étaient beaucoup plus sensibles que les foies d'animaux nourris. Plus précisément, dans cette expérience, la préservation du foie de rat perfusé en continu *ex-vivo* a été plus gravement altérée par le jeûne que par l'ischémie chaude.

L'effet délétère du jeûne observé pourrait s'expliquer par le manque de substrats énergétiques tels que le glycogène ou d'autres composés glyco-géniques [8]. Le glycogène est essentiel pour maintenir l'intégrité cellulaire en fournissant du glucose pour la génération d'adénosine triphosphate (ATP). Les réserves de glycogène, cependant, ne fournissent qu'un apport de glucose à court terme et deviennent particulièrement critiques au-delà de 18-24 h de jeûne [19]. Au fil des ans, il est apparu que dans des conditions physiologiques, l'utilisation du glucose par le foie est limitée et que le glucose est, en fait, un mauvais précurseur du glycogène [4,15]. Cette découverte a été définie comme le "paradoxe du glucose". Une synthèse efficace du glycogène nécessite la présence de glucose et de précurseurs gluconéogéniques comme le fructose, le glycérol, le lactate, mais aussi des acides aminés comme la glutamine ou l'alanine. Plus précisément, l'acide aminé a pour effet de détourner le flux gluconéogénique du glucose-6-phosphate de la production de glucose vers la formation d'uracile-diphosphate de glucose et de glycogène [18].

Théoriquement, les substrats exogènes peuvent également fournir de l'énergie au foie. L'alanine est quantitativement l'acide aminé précurseur de glucose le plus important dans cet organe. Il a été démontré que l'alanine marquée au carbone 14 est incorporée dans le glucose sanguin pendant la nuit et le jeûne prolongé chez l'homme [11]. Dans le cycle dit glucose-alanine, l'alanine sert de transporteur de l'ammoniac et du squelette carboné du pyruvate du muscle au foie. Arrivé dans le foie, le pyruvate est incorporé au glucose et l'ammoniac est converti en urée pour être excrété [9,10]. Le pyruvate est un antioxydant et produit de l'acétyl coenzyme A comme substrat immédiat du cycle de Krebs pour générer de l'ATP [23]. Des études antérieures ont montré que l'alanine présente un effet bénéfique à la reperfusion dans le foie *ex-vivo* de rats et de souris après une ischémie froide [2,24,25]. L'alanine améliore significativement la récupération de l'ATP et la capacité gluconéogénique des foies d'animaux à jeun mais pas d'animaux nourris [2].

On peut émettre l'hypothèse que les effets bénéfiques de l'alanine peuvent également agir lors d'une ischémie normothermique. Par conséquent, cette étude a été conçue pour déterminer si cet acide aminé protège le foie de rat à jeun perfusé *ex-vivo* contre les lésions d'ischémie-reperfusion chaude. Nous avons comparé l'effet de l'alanine au glucose sur l'intégrité hépatique en utilisant des marqueurs biologiques cliniques comme les enzymes ALT, AST, LDH,

$\gamma$ -glutamyltransférase et la phosphatase alcaline. Nous avons également porté une attention particulière aux caractéristiques histologiques de mort cellulaire, c'est-à-dire la nécrose et l'apoptose.

## **Matériels et méthodes**

### Animaux

Des rats Wistar femelles achetés à Harlan Nederland (Horst, Pays-Bas) d'un poids corporel de 150-200 g ont été acclimatés pendant au moins cinq jours à la température ambiante de 24-26°C avec un cycle lumière-obscurité de 12:12 heures. La nourriture et l'eau de laboratoire standard ont été fournies ad libitum. Les aliments ont été retirés 18 heures avec un accès libre à l'eau avant le début de l'expérimentation. Tous les animaux utilisés dans cette étude ont été soignés dans nos installations de recherche animale, et l'expérience a été réalisée après avoir reçu l'approbation du Comité de protection des animaux de l'Université libre de Bruxelles.

### Solution et produits chimiques

Une solution de sel équilibrée de Hank (HBSS) sans albumine a été préparée en utilisant 0,4 g/L de KCl, 0,06 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,35 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,048 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 0,14 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . L'insuline (35 UI/L) et l'HEPES 2,38 g/L ont été ajoutés. Tous ces produits chimiques et l'alanine ont été obtenus auprès de Sigma (Bornem, Belgique). La solution a été saturée avec 100% d' $\text{O}_2$  (0,5 L/min), le pH a été ajusté à 7,35-0,05 en utilisant du NaOH 1,0 M et complétée avec du NaCl pour obtenir 300 mOsm. Les gaz de perfusion (RAPID LAB, Chiron Diagnostics, Halstead, Royaume-Uni) ont été mesurés à l'entrée et dans l'effluent pour assurer une oxygénation adéquate.

### Hépatectomie et perfusion

La procédure de perfusion du foie est décrite ailleurs [28]. Les animaux ont été anesthésiés avec du sodium pentobarbital (NEMBUTAL, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) par voie intrapéritonéale (50 mg/kg), l'abdomen a été ouvert et de l'héparine (1000 IU/kg) a été administrée par la veine cave inférieure. La veine porte a été canulée avec un cathéter de calibre 22, fixé en place et immédiatement perfusé avec la solution décrite précédemment. Le foie a été retiré sous perfusion continue et transféré dans le système fermé *ex-vivo*. Le système (volume du circuit 125 ml) a été maintenu à 37°C. La température du foie a été surveillée à l'aide d'une sonde de température placée sous le foie. Le perfusé, c'est-à-dire la solution d'HBSS enrichie, est passé administré par une pompe péristaltique (ISMATEC REGLO, Fisher Bioblock Scientific, Tournai, Belgique) à un débit de 5 mL/min pour obtenir une pression de perfusion de 12 cm  $\text{H}_2\text{O}$  dans la veine porte.

### Protocole expérimental

L'expérience s'est déroulée en trois phases : (1) le foie a été perfusé pendant 15 minutes ; (2) la perfusion a été arrêtée pendant 60 minutes, le foie étant conservé à 37°C dans le milieu de perfusion; (3) la reperfusion a duré 60 minutes supplémentaires. À différents moments (0, 10, 15, 75, 90, 105, 120, 135 min après le début de la perfusion), des échantillons de 1 ml ont été prélevés dans le perfusé quittant l'organe. De fines biopsies du foie ont été obtenues à 0 et 135 min.

Les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes (n = 10 dans chaque groupe) : les foies ont été perfusés avec soit deux concentrations de glucose, c'est-à-dire 1 et 10 g/L, soit d'alanine 1 et 10 g/L. Le glucose et l'alanine ont été ajoutés au perfusé avant le début de l'expérience.

### Points finaux

L'aspartate aminotransférase (AST, IU/L), l'alanine aminotransférase (ALT, IU/L), la lactate déshydrogénase (LDH, IU/L), la  $\gamma$ -glutamyltransférase (IU/L), la phosphatase alcaline (IU/L), Les concentrations de glucose (mg/dL), de lactate (mg/dL) et de bilirubine (mg/L) ont été mesurées dans le perfusé, à tous les temps, sur un BECKMAN LX20 (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Les biopsies du foie ont été immergées dans du formol à 10%, enrobées dans de la paraffine et traitées par des techniques standard et soumises à un examen histologique. Les coupes ont été colorées avec de l'hématoxyline-éosine et examinées en aveugle pour une analyse morphologique. D'autres sections ont été analysées à l'aide d'une coloration à l'acide périodique schiff (PAS).

#### Mesure de la caspase 3 activée dans le tissu hépatique

L'apoptose a été évaluée par microscopie optique en utilisant une technique d'immunocoloration *in situ* en aveugle. L'activité de la caspase 3 a été mesurée sur des coupes de tissus déparaffinés. L'immunohistochimie, utilisant un anticorps spécifique de la caspase 3 clivée et activée (CASPASE 3 ASP 175, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), a été réalisée après un prétraitement au méthanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour inhiber les peroxydases et en utilisant un kit de réactifs de routine avidine-biotine-immunoperoxydase (AVIDINE-BIOTINE, Vector, Burlingame, CA, USA). Le nombre de cellules apoptotiques a été rapporté sur le nombre d'hépatocytes dans la région sélectionnée et exprimé en pourcentage. Cinq champs de chaque lame colorée ont été analysés.

#### Teneur en glycogène du tissu hépatique

La teneur en glycogène des hépatocytes a été établie à deux temps TO et T135 minutes à l'aide du logiciel NIH-IMAGE (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [27,28,29]. À l'aide d'un appareil de mesure composé d'un ordinateur personnel et d'un vidéomicroscope (LEITZ DIALUX 20ES, Leitz, Wetzlar, Allemagne), les lames colorées par l'acide périodique Schiff ont été visualisées avec un objectif X 40. La teneur en glycogène dans les hépatocytes a été établie comme suit [28]. Une région périportale et centrolobulaire ont d'abord été identifiées au microscope. Quarante hépatocytes dans la zone médiane de l'acinus ont été analysés. Pour l'évaluation des lames PAS à l'aide de NIH-IMAGE, des images ont été saisies sur le disque dur de l'ordinateur du poste de travail. Par la suite, les images capturées peuvent être ouvertes dans le programme NIH-IMAGE pour l'évaluation des indices de positivité des lames PAS. NIH-IMAGE fournit la valeur de gris moyenne dans les régions d'intérêt sélectionnées et cette valeur est la somme des valeurs de gris de tous les pixels de la sélection divisée par le nombre de pixels. Deux champs de chaque diapositive PAS colorée ont été analysés. À partir de ces données de zone, l'indice de glycogène de l'image a été calculé, et exprimé en pourcentage.

### Méthodes statistiques

Les résultats biologiques ont été exprimés en terme de moyenne et d'écart-type (SD). Les courbes de réponse dans les différentes conditions expérimentales ont été obtenues par simple interpolation linéaire entre des points temporels consécutifs (0-135 min). Pour les enzymes, une transformation logarithmique a été appliquée pour normaliser les distributions et stabiliser les variances. Tous les calculs statistiques ont ensuite été effectués sur les valeurs transformées. Les courbes de réponse ont été comparées par la méthode développée par Zerbe [32]. Cette approche, qui ne fait aucune hypothèse sur le type d'évolution, permet de comparer les courbes de réponse non seulement sur toute la période d'étude mais aussi pour des intervalles de temps prédéfinis, c'est-à-dire respectivement avant l'ischémie (0-15 min), pendant l'ischémie (15-75 min) et après l'ischémie (75-135 min).

Les taux de glycogène et le marquage des cellules par la caspase 3 activée au temps 0 et après 135 min ont été comparés par un test t de Student apparié. Tous les résultats ont été considérés comme significatifs au niveau critique de 5 % ( $P < 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant les logiciels SAS version 9.1 pour Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA) et S-PLUS version 6.2 pour Windows (MathSoft Inc, Seattle, WA, USA).

### Résultats

Les foies sont apparus normaux et de couleur uniforme tout au long de la période d'étude dans tous les groupes.

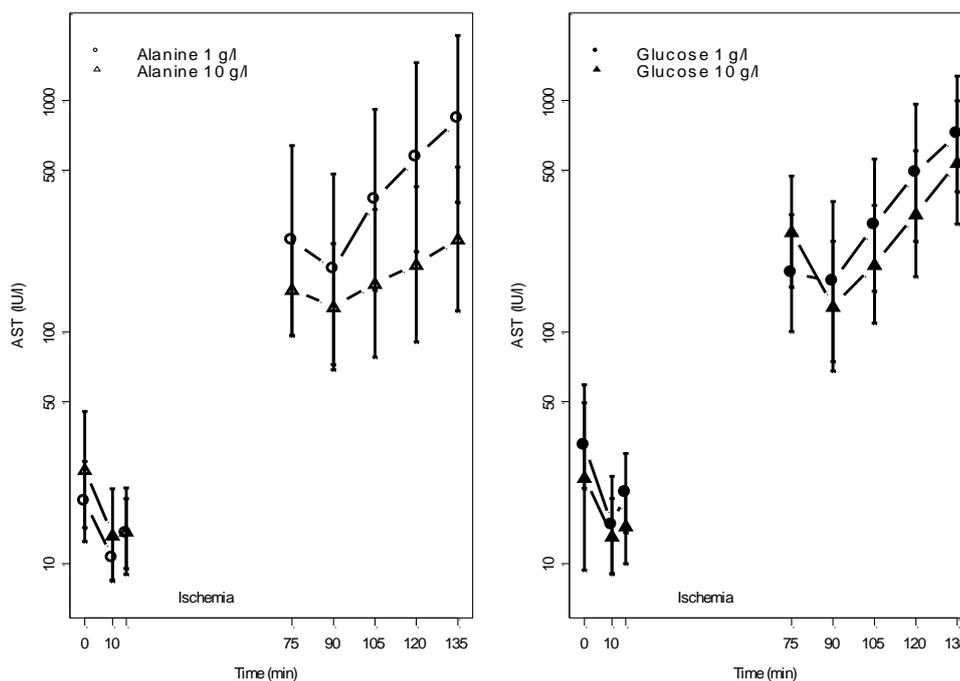
#### Enzymes

Comme le montre la **figure 6.2.2.1A-C**, les profils enzymatiques étaient similaires dans chaque groupe, avec une légère diminution immédiatement après le début de l'expérience, suivie d'une augmentation globale de la libération des enzymes dans le perfusé jusqu'à la fin de l'expérience. Pendant la phase de réoxygénation, les taux d'AST du perfusé

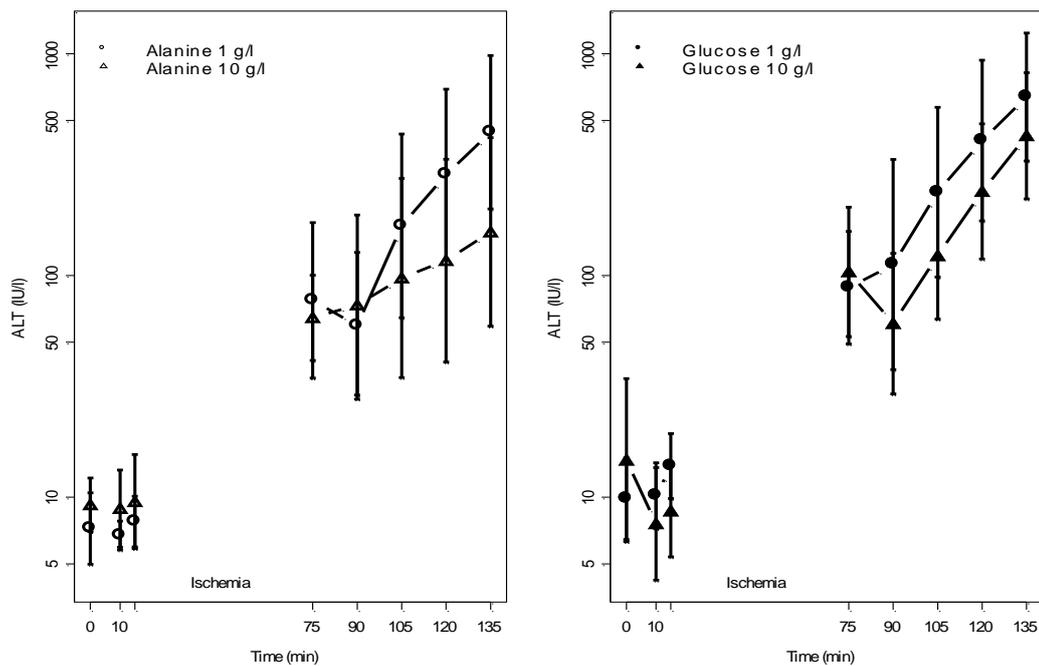
(voir **Fig. 6.2.2.1A**) étaient plus élevés dans les groupes glucose et alanine à 1 g/L que dans le groupe traité à l'alanine 10 g/L ( $P < 0,05$ ). Le profil des courbes d'ALT et de LDH était similaire à celui de l'AST, comme le montrent les figures 1B et C. Alors que la réoxygénation augmentait la libération d'ALT et de LDH dans les quatre groupes, les taux d'ALT et de LDH du perfusat étaient plus élevés dans les foies traités au glucose et dans les foies traités à l'alanine 1 g/L que dans le groupe traité à l'alanine 10 g/L ( $P < 0,05$ ). Les valeurs d'AST, d'ALT et de LDH enregistrées à la fin de l'expérience (135 min) sont présentées dans le **tableau 6.2.2.1**.

La concentration de  $\gamma$ -glutamyltransférase et de phosphatase alcaline dans le perfusat était faible dans tous les groupes (inférieure à 5 UI/L) sans différence significative entre les foies de rats traités au glucose et à l'alanine (données non présentées).

A



B



C

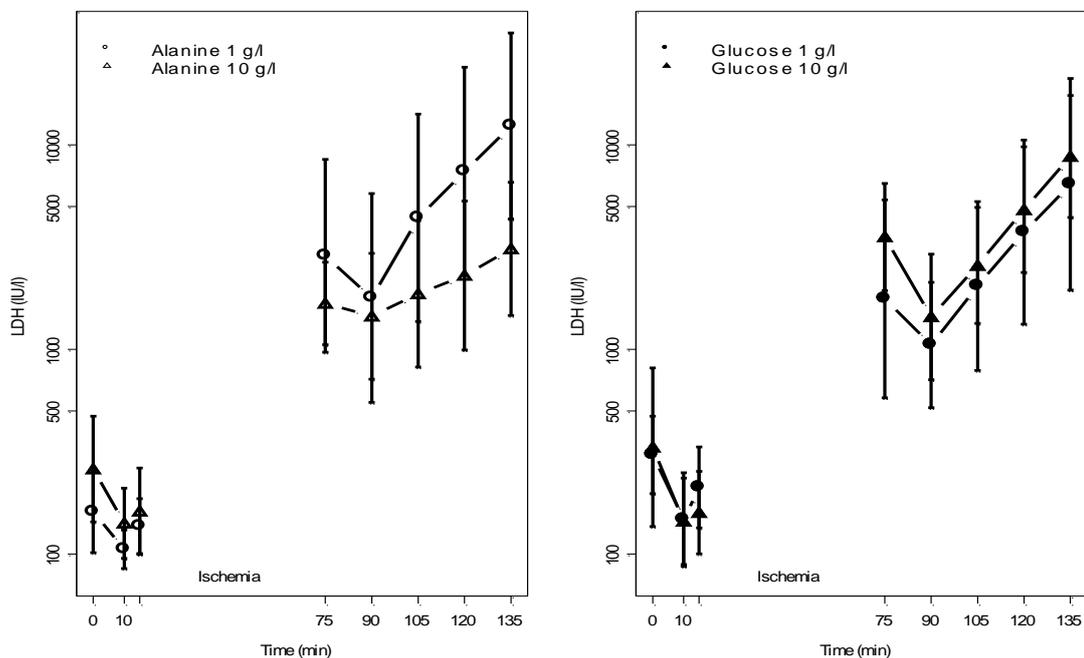


Fig 6.2.2.1 :

- A) Concentration d'aspartate aminotransférase (AST)  
 B) Concentration d'alanine aminotransférase (ALT)  
 C) Concentration de lactate déshydrogénase (LDH) dans le perfusé aux différentes phases de l'expérimentation (exprimées en moyenne  $\pm$  SD). Pendant la réoxygénation du foie (75-135 min), les niveaux d'enzymes dans le perfusé étaient plus élevés dans les 2 groupes de glucose et dans le groupe alanine 1g/L en comparaison au groupe alanine 10g/L ( $p < 0,05$ ). Les concentrations sont exprimées en échelle logarithmique. UI = unité internationale,  $n = 10$  dans chaque groupe

**Table 6.2.2.1-Variables biologiques mesurées à 135 minutes dans le perfusat (n = 10 dans chaque groupe)**

Variables	Glucose 1 g/L	Glucose 10 g/L	Alanine 1 g/L	Alanine 10 g/L
AST (IU/L)	826 ± 478	626 ± 500	1,102 ± 886	315 ± 214 *
ALT (IU/L)	787 ± 612	510 ± 302	557 ± 361	230 ± 187 *
LDH (IU/L)	8,879 ± 4,545	10,630 ± 6,319	18,060 ± 14,862	3,957 ± 2,775 *
Lactate (mg/dL)	3.9 ± 3.6	17.1 ± 7.9 <sup>†</sup>	2.5 ± 5.2	5.4 ± 4.5

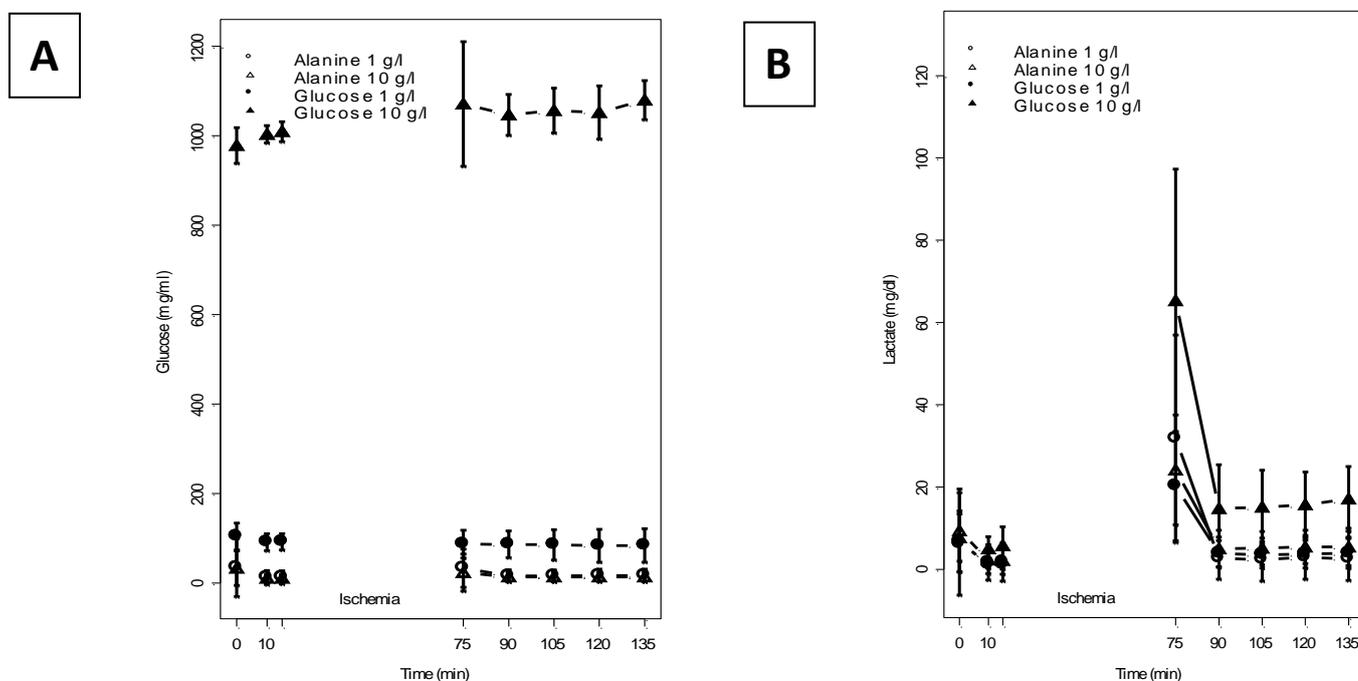
\* P < 0.05 vs. Glucose and alanine 1 g/L groupes; <sup>†</sup> P < 0.01 vs. autres groupes; AST = aspartate aminotransférase; ALT = alanine aminotransférase; LDH = lactate déshydrogénase; IU = Unité internationale.

### Glucose, lactate et bilirubine

Les taux de glucose dans le perfusat des différents groupes sont indiqués sur la **figure 6.2.2.A**. Globalement, les concentrations de glucose étaient les plus élevées dans le foie traité au glucose 10 g/L par rapport aux foies traités au glucose 1 g/L et à l'alanine (P < 0,01).

L'ischémie a provoqué une élévation du taux de lactate au moment de la reperfusion, principalement dans les groupes ayant reçu 10 g/L de glucose (P < 0,01 par rapport aux groupes traités à l'alanine) (voir **Fig. 6.2.2.B**). Les concentrations de lactate à la fin des expériences sont indiquées dans le **tableau 6.2.2.1**.

Les taux de bilirubine sont restés faibles dans tous les groupes et aucune différence significative n'a été observée entre les conditions expérimentales.

**Fig 6.2.2.2:**

A) Concentration en glucose

B) Concentration en lactate dans les perfusats durant les différentes phases de l'expérimentation (moyenne ± SD)

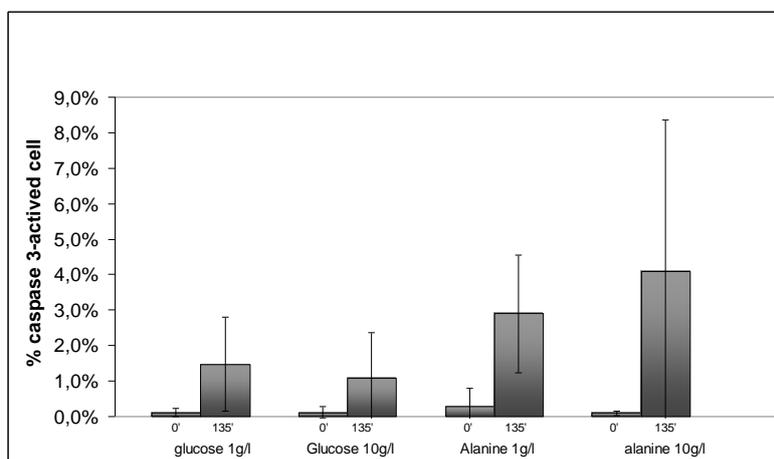
L'ischémie cause une augmentation du lactate au moment de la reperfusion principalement dans le groupe glucose 10g/L (p < 0,01) (n = 10 dans chaque groupe).

## Histologie

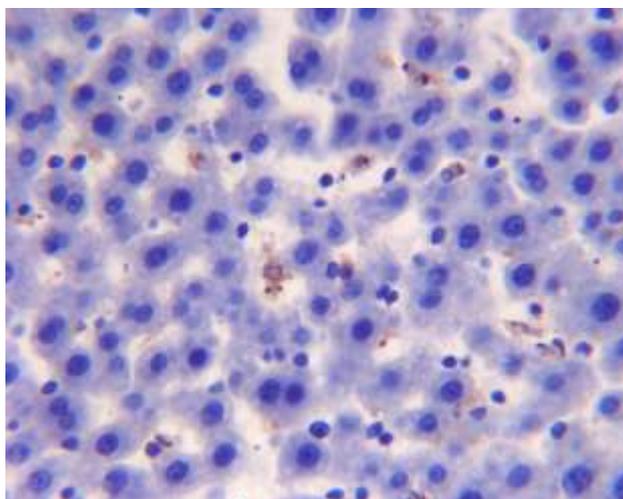
Aucune différence n'a été observée entre les quatre groupes dans les lames de foie colorées à l'hématoxyline-éosine. Les hépatocytes et les cellules sinusoidales présentaient une morphologie normale. Aucun hépatocyte nécrosé n'a été trouvé dans les différents groupes. Aucun signe d'inflammation n'était présent. Des changements minimes, consistant principalement en hépatocytes occasionnels avec vacuolisation ou ballonnement, ont été observés dans les foies des quatre groupes de rats à la fin de l'expérience. Des zones de vacuolisation hépatocellulaire, de décollement de la muqueuse endothéliale et de légère congestion sinusoidale ont été observées dans les quatre groupes. Cependant, l'architecture acinaire a toujours été maintenue (données non présentées).

### Mesure de la caspase 3 activée

Les résultats sont présentés à la **figure 6.2.2.3**. L'ischémie-reperfusion augmente le nombre de cellules marquées par la caspase 3 activée dans tous les groupes ( $P < 0,05$ ). Le pourcentage de cellules apoptotiques était plus élevé dans les foies traités à l'alanine à 10 g/L que dans les autres groupes ( $P < 0,05$ ) (voir **Fig. 6.2.2.4**). L'alanine augmente l'activité de la caspase 3 principalement dans les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales.



**Fig 6.2.2.3** : Histogramme indiquant les pourcentages de cellules marquées par la caspase 3 activée au début et en fin d'expérimentation. L'ischémie-reperfusion augmente le nombre de cellules apoptotiques dans tous les groupes expérimentaux ( $p < 0,05$ ). Le pourcentage de cellules apoptotiques était le plus important dans le groupe alanine 10g/L ( $p < 0,05$ ). (n = 10 dans chaque groupe).



**Fig 6.2.2.4**: image microscopique d'une lame de foie de rat traité avec de l'alanine et marquée par un anticorps anti-caspase 3 activée à 135 minutes. Le marquage est observé de manière prédominante dans les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer.

### Teneur en glycogène des hépatocytes

Les teneurs en glycogène hépatique des différentes conditions expérimentales sont indiquées dans le **tableau 6.2.2.2**. Le glycogène a diminué de manière significative dans les groupes traités au glucose entre 0 et 135 min ( $P < 0,05$ ). Le glycogène était significativement plus élevé dans les groupes traités au glucose 10 g/L que dans les groupes traités au glucose 1 g/L et à l'alanine au début de l'expérience ( $P < 0,01$ ). À la fin de la reperfusion, la concentration de glycogène était la plus faible dans le groupe ayant reçu 1 g/L de glucose ( $P < 0,01$ ).

**Tableau 6.2.2.2.**  
**Evolution du contenu en glycogène des hépatocytes, exprimé en pourcentage (%), dans les 4 groupes expérimentaux au temps 0 et en fin d'expérimentation (n = 10 dans chaque groupe)**

Group	Glycogen 0 min	Glycogen 135 min	P-value
Glucose 1 g/L	10.8 ± 7.6	5.2 ± 2.7	0.05
Glucose 10 g/L	21.8 ± 3.2	17.9 ± 4.0	0.03
Alanine 1 g/L	16.4 ± 8.8	14.2 ± 9.6	0.64
Alanine 10 g/L	12.2 ± 3.5	10.5 ± 5.3	0.46

### Discussion

Les résultats de la présente étude montrent que l'alanine, à des concentrations de 10 g/L, diminue l'étendue des lésions d'ischémie-reperfusion dans le foie du rat à jeun. Dans les conditions expérimentales actuelles, l'alanine a un effet protecteur comme le suggère le plus faible flux d'enzymes (AST, ALT et LDH). Ces mesures ont été utilisées précédemment comme indicateurs de dommages hépatocellulaires [13,28,29].

Le glucose à des concentrations de 1 ou 10 g/L semble moins efficace pour protéger le foie des animaux à jeun que l'alanine. Des études antérieures avec des foies perfusés ont montré que l'absorption de glucose était très faible [4, 14, 26, 30]. Ce fait explique l'utilisation limitée du glucose par le foie. Chez les rats, il a été démontré que la capacité d'utilisation du glucose est limitée et que le dépôt de glycogène dans le foie résulte principalement d'un processus gluconéogénique [18]. Cela pourrait expliquer le faible effet protecteur du glucose observé dans notre étude. Le Couteur et Al [20] ont montré que la reperfusion du foie perfusé *ex-vivo* entrave le transport du glucose à travers la membrane cellulaire chez les rats à jeun. L'utilisation d'un perfusé sans éléments figurés du sang dans notre modèle de foie perfusé implique certaines limitations, il n'existe pas d'interaction des érythrocytes comme ce qui pourrait se passer *in vivo*. Lorsque le milieu de perfusion contient des érythrocytes, l'absorption du glucose est nettement accrue [18]. Ce fait rend difficile la comparaison avec nos résultats. La production de lactate au moment de la reperfusion est plus élevée dans les foies traités au glucose par rapport aux foies traités à l'alanine, conséquence probable de la glycolyse anaérobie.

Nos résultats sont en accord avec les expériences précédentes, comme celle d'Arnault et al. [2] où l'alanine, ajoutée lors de la reperfusion dans un foie de rat perfusé *ex-vivo* après 24 heures d'ischémie froide, exerce un effet bénéfique en améliorant significativement la récupération de l'ATP et la capacité gluconéogénique des foies d'animaux à jeun. Plus la période de jeûne est longue, plus ses effets sont délétères et plus l'alanine les compense. L'alanine peut exercer son effet protecteur spécifique sur les foies des animaux à jeun en agissant métaboliquement comme un substitut aux substrats endogènes manquants, tels que le glycogène. L'alanine est un acide aminé clé pour la production d'ATP par le pyruvate et le cycle de Krebs, améliorant ainsi la récupération de l'énergie et des fonctions du foie [3,24]. En revanche, l'ajout de pyruvate n'a pas amélioré la récupération des foies soumis à une période de jeûne de 72 heures avant une ischémie de 24 heures, ce qui plaide contre un seul effet métabolique de l'alanine [2]. La présence d'une

fonction amine (groupe -NH<sub>2</sub>) dans l'alanine représente l'une des principales différences biochimiques par rapport au pyruvate. L'alanine fournit à la fois des calories et de l'azote, alors que le pyruvate ne fournit que des calories. Lopez et ses collaborateurs [21] ont quantifié l'importance de l'alanine pour le métabolisme hépatique de l'azote et ont montré qu'elle était le principal acide aminé utilisé par le foie. En ce qui concerne la contribution globale des acides aminés à la production de glucose dans l'état de jeûne post-absorptif de la nuit, 75 % de la production de glucose est due à la glycogénolyse plutôt qu'à la gluconéogenèse. C'est principalement lorsque les réserves de glycogène sont épuisées et que la production de glucose dépend de la gluconéogenèse que la disponibilité de l'alanine prend une importance clinique dans la régulation du glucose sanguin [11].

Dans une étude précédente utilisant le même modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo*, Stadler et al. [29] ont montré que l'administration d'Intralipid®, une solution contenant de l'huile de soja, des phospholipides d'œufs et du glycérol, diminuait l'étendue des lésions de reperfusion chez les animaux à jeun par rapport aux groupes traités au glucose. Les auteurs ont conclu que la  $\beta$  oxydation des acides gras et la cétogenèse plutôt que l'oxydation du glucose sont considérées comme une source majeure d'énergie pour les hépatocytes. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse actuelle sur le mécanisme d'action de l'alanine.

Les cellules non-parenchymateuses sont d'importants médiateurs des lésions d'ischémie-reperfusion. Il est communément admis que la phase initiale de lésion lors de la reperfusion est caractérisée par un stress oxydant induit par les cellules endothéliales et par les cellules de Kupffer [6]. Dans le foie *in vivo*, les cellules de Kupffer activées libèrent des radicaux libres, des cytokines, des chimiokines et d'autres facteurs, ce qui entraîne l'infiltration et l'activation des cellules du système immunitaire inné, y compris les neutrophiles et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [6,16,17,33]. Ces agents cytotoxiques pourraient se diffuser dans les cellules endothéliales ou les hépatocytes et causer des lésions microvasculaires [1]. La suppression des cellules de Kupffer améliore les lésions d'ischémie-reperfusion [31]. Dans notre expérience, nous avons observé que l'ischémie-reperfusion augmente l'activation de la caspase 3 spécifiquement dans les cellules Kupffer et endothéliales, et non dans les hépatocytes. L'activation de la caspase 3 conduit à l'apoptose et à la résorption ordonnée des cellules de Kupffer qui minimise les réponses inflammatoires et la fuite des composants cellulaires dans l'espace extracellulaire [1]. L'absence d'inflammation différencie l'apoptose de la nécrose. Comme l'intégrité de la membrane de la cellule apoptotique est maintenue, il n'y a pas de fuite d'enzymes lysosomales pouvant endommager les cellules voisines ou provoquer des réactions immunitaires [22] tandis que la nécrose induit la libération d'enzymes [13]. Dans notre expérience, nous avons observé la plus grande concentration de LDH, un marqueur de la mort cellulaire, dans le groupe traité au glucose.

Les cellules ont besoin d'ATP pour maintenir leurs fonctions vitales et, paradoxalement, pour entrer en apoptose [17]. Le pourcentage de cellules Kupffer présentant une activation de la caspase 3 est plus élevé dans les foies traités à l'alanine que dans les autres groupes. L'exécution du programme apoptotique comprend des étapes dépendantes de l'énergie, comme la production soutenue d'ATP par l'alanine. Cette augmentation de l'apoptose des cellules Kupffer induite par l'alanine par rapport aux autres groupes pourrait expliquer en partie la réduction des lésions de reperfusion.

Le mécanisme de l'effet protecteur de l'alanine contre le stress oxydatif hépatique doit être étudié de manière plus approfondie avant de pouvoir tirer des conclusions définitives. Notre étude est principalement descriptive et non mécanistique. Bien que les effets observés aux niveaux enzymatiques soient clairs, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer notre hypothèse sur les mécanismes énergétiques impliqués dans l'effet protecteur de l'acide aminé contre les lésions de reperfusion hépatique chez les animaux à jeun, par exemple l'utilisation du glycogène, le niveau hépatique d'ATP et l'oxydation de l'alanine.

En conclusion, ces expériences montrent que l'alanine, à une concentration de 10 g/L dans le perfusat, atténue les lésions hépatocellulaires dans les foies de rats à jeun après une ischémie-reperfusion normothermique *ex-vivo*, en comparaison au glucose. Les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur de l'alanine doivent être élucidés.

## Bibliographie

- (1) Alison MR, Sarraf CE (1994). Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 35: 577-581.
- (2) Arnault I, Bao YM, Dimicoli JL, Lemoine A, Sebah M, Adam R (2002). Combined effects of fasting and alanine on liver function recovery after cold ischemia. *Transplant International* 15:89-95.
- (3) Astarcioglu I, Adam R, Dimicoli JL, Gigou M, Patry J, Sebah M, Bismuth H (1995). Protective effect of alanine against graft failure of transplanted livers from fasted donor rats. *Transplantation Proceedings* 27: 507-508.
- (4) Boyd ME, Albright EB, Foster DW, McGarry JD (1981). In vitro reversal of the fasting state of liver metabolism in the rat. Reevaluation of the roles of insulin and glucose. *Journal of Clinical Investigation* 68: 142-152.
- (5) Bradford BU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG (1986). New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 236: 263-268.
- (6) Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB (2005). Divergent functions of CD4+ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 289: G969-G976.
- (7) Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ (1991). Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 13: 83-95.
- (8) Caraceni P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M (1999). Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology* 29: 1139-1146.
- (9) Dolle A (2000). Metabolism of D- and L-[13C] alanine in rat liver detected by 1H and 13C NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *NMR in Biomedicine* 13: 72-81.
- (10) Felig P, Wahren J (1974). Protein turnover and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis. *Federation Proceedings* 33: 1092-1097.
- (11) Felig P (1975). Amino acid metabolism in man. *Annual Review of Biochemistry* 44: 933-955.
- (12) Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Caraceni P, Van Thiel D (1993). Fasting enhances the effects of anoxia on ATP, Cai++ and cell injury in isolated rat hepatocytes. *Biochimica Biophysica Acta* 1178: 9-19.
- (13) Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF (1986). The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 6: 511-517.
- (14) Huang MT, Veech RL (1988). Role of the direct and indirect pathways for glycogen synthesis in rat liver in the postprandial state. *Journal of Clinical Investigation* 81: 872-878.
- (15) Hue L, Bontemps F, Hers H (1975). The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations. *Biochemical Journal* 152: 105-114.
- (16) Jaeschke H, Farhood A (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *American Journal of Physiology* 260: G355-G362.
- (17) Jaeschke H, Lemasters JJ (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125: 1246-1257.
- (18) Katz J, McGarry JD (1984). The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? *Journal of Clinical Investigation* 74 : 1901-1909.
- (19) Klover PJ, Mooney RA (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 753-758.
- (20) Le Couteur DG, Rivory LP, Pond SM (1994). Glucose transport and hypoxia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9: 385-390.
- (21) Lopez HW, Moundras C, Morand C, Demigne C, Remesy C (1998). Opposite fluxes of glutamine and alanine in the splanchnic area are an efficient mechanism for nitrogen sparing in rats. *Journal of Nutrition* 128: 1487-1494.
- (22) Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006). Apoptosis and necrosis in the liver. A tale of two deaths? *Hepatology* 43: S31-S44.
- (23) Mallet RT (2000). Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223: 136-148
- (24) Patry J, Adam R, Blouquit Y, Astarcioglu I, Dennison A, Dimicoli JL, Bismuth H (1996). Beneficial effect of alanine on metabolic recovery of fasted livers submitted to cold ischemia. *NMR in Biomedicine* 9: 249-260.
- (25) Patry J, Adam R, Dimicoli JL (1999). The effect of dichloroacetate and alanine on the metabolic recovery of perfused mouse liver after cold ischemia. *NMR in Biomedicine* 12: 387-394.

- (26) Plauth M, Zimmermann B, Raible A, Vieillard-Baron D, Bauder-Gross D, Hartmann F (1991). Use of an artificial oxygen carrier in isolated rat liver perfusion: first demonstration of net glucose uptake at physiological portal glucose concentrations using a hemoglobin-free perfusate. *Research in Experimental Medicine* 191: 339-347.
- (27) Sato S (2004). Ultrastructural and morphometric studies of normal rat hepatocytes. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 36: 131-140.
- (28) Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG (2005). Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology* 103: 978-986.
- (29) Stadler M, Nuyens V, Boogaerts JG (2007). Intralipid minimizes hepatocytes injury after anoxia-reoxygenation in an ex vivo rat liver model. *Nutrition* 23: 53-61.
- (30) Storer GB, Topping DL, Trimble RP (1981). Direct stimulation by glucose and insulin of glycogen synthesis in perfused rat liver. *FEBS Letters* 136: 135-137.
- (31) Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, Wouters PJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe G (2005) Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *The Lancet* 365: 53-59.
- (32) Zerbe GO (1979). Randomization analysis of the completely randomized design extended to growth and response curves. *Journal of the American Statistical Association* 74: 215-221.
- (33) Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF (1997). CD4(+). T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *Journal of Clinical Investigation* 100: 279-289.

### **6.3. Identification du mécanisme protecteur : l'autophagie**

Un troisième travail doctoral publié montre que la capacité de mobilisation énergétique et, à ce titre, l'autophagie contribue à l'hépatoprotection du foie isolé

#### **3<sup>ème</sup> Article publié : La protection dans un modèle de lésion hépatique est corrélée à la capacité de mobilisation énergétique dans le cadre d'un état nutritionnel distinct.**

#### **Résumé**

**Objectif :** La restriction alimentaire et énergétique sont impliquées dans la protection contre les lésions cellulaires expérimentales. Une baisse du statut énergétique des cellules en dessous d'un seuil critique peut empêcher la protection comme on l'a déjà observé pour des foies isolés de rats soumis à un jeûne de 18 heures lorsqu'on les compare aux foies de rats nourris. Dans ce dernier modèle, les liens entre l'état nutritionnel, la disponibilité énergétique et la protection sont étudiés plus en détail par l'allongement du jeûne des rats à 24 heures et le retrait des sources d'énergie des perfusions.

**Méthodes :** Des foies de rats nourris, à jeun 18 h et 24 h perfusés *ex-vivo* sans éléments nutritionnels ont été étudiés pendant 135 minutes pour la cytolyse (potassium, ALT, AST, LDH libérés dans les perfusats), la mort cellulaire (caspase-3 activée [apoptose], rapports LC3II/actine et p62/actine [autophagie]), les réserves de glycogène, la production de glucose et de lactate.

**Résultats :** La cytolyse est augmentée de manière significative par un jeûne de 18 heures et de 24 heures par rapport à l'alimentation, mais est réduite de manière inattendue par un jeûne de 24 heures par rapport à un jeûne de 18 heures. Le marqueur apoptotique caspase 3 augmente de manière significative dans des conditions d'alimentation et de jeûne de 18 heures mais pas de jeûne de 24 heures. Le marqueur autophagique LC3II/actine augmente significativement pendant la perfusion dans le groupe à jeun 24h mais pas dans les groupes nourris et à jeun 18h. L'induction autophagique est également confirmée par une baisse du rapport p62/actine. Sous perfusion avec du 3-méthyladénine, un inhibiteur classique de l'autophagie, la protection et l'autophagie accrue fournies par le jeûne de 24 h contre 18 h sont perdues sans affecter l'apoptose.

**Conclusions :** La protection hépatique est influencée par l'état nutritionnel de manière parallèle aux capacités de mobilisation de l'énergie hépatique (glycogène plus autophagie) avec dans l'ordre décroissant des protections : foies de rat nourri > jeun 24h > jeun 18h > jeun 24h +3MA. En montrant que l'induction de l'autophagie limite la cytolyse induite par le jeûne, le présent travail soutient l'opinion émergente selon laquelle les inducteurs d'autophagie pourraient contribuer aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire.

#### **Introduction**

Les propriétés protectrices de la restriction alimentaire et énergétique dans des modèles de santé, de vieillissement et de maladie évaluées par des modèles expérimentaux ont mis en lumière l'idée qu'une baisse de la disponibilité énergétique des cellules en dessous d'un seuil critique peut empêcher la protection [1]. Ce dernier aspect a été déduit d'études sur des foies de rat perfusés *ex-vivo*, rat préalablement soumis à un jeûne de 18 heures par rapport à l'alimentation, et montrant une exacerbation de la cytolyse hépatique *ex-vivo* par le jeûne de 18 heures [1]. À cet égard, la nécrose, l'apoptose et l'autophagie représentent respectivement des morts cellulaires accidentelles, programmées et programmées avec une survie optionnelle [2,3]. L'apoptose extrinsèque et intrinsèque recrute la membrane plasmique (complexe de signalisation induisant la mort DISC) et les apoptosomes solubles, respectivement [4] pour déclencher l'auto-activation des caspases d'initiation qui, à leur tour, activent les caspases d'exécution pour le clivage des protéines et les changements observés pendant l'apoptose [5]. L'autophagie implique des autophagosomes (englobant les composants intracytoplasmiques et les organelles) qui fusionnent avec les lysosomes pour permettre la dégradation de leur contenu ; elle peut entraîner la mort des cellules ou, en cas de privation de nutriments [6], fournir une énergie compatible avec la survie des cellules [7].

Comme mentionné ci-dessus, l'exacerbation de la cytolyse et la chute sous un seuil d'énergie critique ont été précédemment documentées dans des foies perfusés *ex-vivo* provenant de rats mis à jeun 18 heures en comparaison aux rats nourris [1,8]. L'objectif principal de la présente étude était de travailler sous perfusion privée d'énergie et d'effectuer un allongement de la période de jeûne à 24h avant le début de l'expérimentation. L'allongement du temps de jeûne a été effectué pour fournir une exacerbation supplémentaire de la susceptibilité à la cytolyse hépatique provoquée par le jeûne, précédemment observée dans notre modèle de foie [1]. La raison de cette stratégie était d'amplifier et donc de mieux caractériser les principaux déterminants responsables de la différence observée dans la cytolyse entre les états nourris et à jeun. De manière inattendue, l'exacerbation de la cytolyse a été réduite par l'augmentation de la période de jeûne. Cela a conduit, dans un deuxième temps, à envisager des mécanismes qui pourraient protéger le foie contre la cytolyse provoquée par le jeûne. En fait, l'évaluation des voies de mort cellulaire (apoptose et autophagie) ainsi que des réserves énergétiques dans divers états nutritionnels permet de mieux comprendre deux caractéristiques de notre modèle de foie : les différences de cytolyse entre les états de jeûne et nourris et les mécanismes qui pourraient protéger contre l'exacerbation de la cytolyse due au jeûne. L'apoptose est évaluée par mesure de la caspase-3 activée (apoptose extrinsèque et intrinsèque) [9]. L'autophagie est évaluée par l'augmentation du rapport LC3II/actine (et la diminution du rapport p62/actine) [10-12], et est modulée par le 3-méthyladénine (3MA), un inhibiteur spécifique de l'autophagie [13].

## **Matériels et méthodes**

### **Éthique**

Toutes les études sur les animaux ont été autorisées par le Comité d'utilisation et d'examen des soins aux animaux de l'Université libre de Bruxelles (CEBEA-IBMM-2014-39).

### **Animaux**

Des rats Wistar femelles achetés aux Laboratoires Charles River (Saint Germain Nuelles, France) d'un poids corporel de 200 g ont été acclimatés pendant au moins cinq jours à la température ambiante de 24-26°C avec un cycle lumière-obscurité de 12:12 heures. La nourriture et l'eau de laboratoire standard ont été fournies *ad libidum*. Les animaux ont été répartis au hasard entre des groupes nourris (n=15) et des groupes à jeun (n ≥ 10 dans chaque groupe) : des groupes à jeun 18h (n=15) et à jeun 24h (n=10) ayant un accès libre à l'eau, la nourriture étant retirée respectivement 18 et 24h avant l'isolement du foie. Des foies du groupe de rats à jeun 24h ont été traités par l'administration, dans le perfusé, de 3-méthyladénine (3MA) (n=10), évitant ainsi l'exposition des animaux aux effets secondaires du composé *in vivo*.

### **Solutions et produits chimiques pour les perfusions hépatiques**

La solution saline équilibrée de Hank (HBSS) sans albumine comprenait 0,4 g/L de KCl, 0,06 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,35 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,048 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,14 g/L de CaCl<sub>2</sub>. De l'HEPES (2,38 g/L) a été ajouté à la solution de perfusion. Tous les produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma (Bornem, Belgique). La solution a été saturée avec 100 % d'O<sub>2</sub> (0,5 L/min), le pH a été ajusté à 7,35 ± 0,05 en utilisant du NaOH 1,0 M et complétée avec du NaCl pour obtenir 300 mOsm. Dans le perfusé du groupe de rats à jeun 24h ayant reçu le 3-méthyladénine (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), le composé à 5 mM a été ajouté au perfusé. Les groupes à jeun 24h+3MA et à jeun 24h ont été perfusés avec des mélanges HBSS complétés ou non avec 3MA (5 mM), respectivement.

### **Hépatectomie et perfusion hépatique *ex-vivo***

La procédure d'ablation du foie et de perfusion a été décrite en détails précédemment [8,14]. En bref, les animaux ont été anesthésiés avec du sodium pentobarbital (NEMBUTAL®, Ceva, Libourne, France) par voie intrapéritonéale (50 mg/kg), l'abdomen a été ouvert et de l'héparine (5000 UI/kg) a été administrée par la veine cave inférieure. La veine porte a été canulée avec un cathéter de calibre 22, fixée en place et immédiatement perfusée avec la solution adéquate. Le foie a été retiré sous perfusion continue et transféré dans le système fermé *ex-vivo*. Le système (volume

du circuit de 125 ml) a été maintenu à 37°C. Le perfusé, c'est-à-dire la solution de HBSS enrichie ou non de 3MA (5 mM), est administrée par une pompe péristaltique (ISMATEC REGLO, Fisher Bioblock Scientific, Tournai, Belgique) à un débit de 5 mL/min pour obtenir une pression de perfusion d'environ 12 cm H<sub>2</sub>O dans la veine porte.

### **Protocole général pour les biopsies du foie et échantillonnage du perfusé**

Le protocole prévoyait 135 minutes de perfusion des foies avec les solutions respectives. Des échantillons de perfusé ont été prélevés toutes les 15 min et des biopsies hépatiques à 0 et 135 min. Les biopsies ont été immergées instantanément soit dans l'azote liquide avec stockage à -80°C avant détermination des marqueurs de l'autophagie LC3II et p62, soit dans du formol à 10% avant inclusion différée dans la paraffine pour analyse immunohistochimique de la caspase-3 (apoptose) et coloration à l'acide périodique Schiff (glycogène).

Pour les mesures d'apoptose, des lames histologiques sont préparées à partir des biopsies paraffinées. Ces lames ont été maintenues à température ambiante pendant 24 heures avant d'être traitées pour l'immunocoloration de la caspase-3 mentionnée ci-dessous dans la sous-section expérimentale intitulée "Apoptose et caspase-3".

Pour la coloration PAS, le déparaffinage des tranches de foie et la coloration à l'acide périodique ont été réalisés par un appareil Tissue Tek Prisma® (Sakura, Europe). Les lames de foie colorées par le PAS ont été traitées pour déterminer la teneur en glycogène des hépatocytes à deux moments, c'est-à-dire 0 et 135 min, à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [14]. Cinq champs par lame colorée PAS ont été analysés par un vidéo-microscope (LEITZ DIALUX 20ES, Leitz, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif x40 et combiné à un ordinateur personnel [8]. Les images générées ont été enregistrées sur le disque dur de l'ordinateur du poste de travail. Par la suite, les images capturées ont été ouvertes dans le programme Image J (NIH, Bethesda, Maryland, États-Unis) pour évaluer les indices de positivité des photographies de lames colorées au PAS. Nous avons sélectionné le seuil de la teneur en glycogène de toutes les cellules (valeur X) et nous l'avons rapporté à la surface de toutes les cellules (valeur Y). À partir de ces données de surface, nous avons calculé l'indice de glycogène pour l'image, et l'avons exprimé en pourcentage (X/Y).

### **Marqueurs de perfusion et contenu en glycogène de la biopsie du foie**

L'aspartate aminotransférase (AST, IU/L), l'alanine aminotransférase (ALT, IU/L), la lactate déshydrogénase (LDH, IU/L), le glucose (mg/dl), le lactate (mmol/L) et le potassium (mEq/L) ont été dosés dans les échantillons de perfusé sur un Architect plus CI4100 (Abbott Diagnostics, IL, USA). Les teneurs en glycogène ont été déterminées comme indiqué ci-dessus.

### **Apoptose et caspase-3 activée**

L'apoptose a été évaluée par microscopie optique après immunocoloration *in situ*. Des sections de foie déparaffinées ont été prétraitées : tampon chaud au citrate pH 6, inhibition des endoperoxydases avec du méthanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour bloquer les réactions croisées (Immunologic, Duiven, Pays-Bas) et inhibition de l'endo-biotine (Vector, Burlingame, CA, USA). Les lames ont été incubées à 4°C pendant la nuit en utilisant un anticorps primaire spécifique pour la Caspase-3 clivée activée (CASPASE-3 ASP 175, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) à une dilution de 1:100. L'amplification du signal a été réalisée avec l'incubation du complexe Ultrasens Streptavidin Peroxidase RTU (Immunologic, Duiven, Pays-Bas). La révélation a été faite avec de la diaminobenzidine (Biogenex, Fremont, CA, USA). Les lames ont été contre-colorées avec du bleu de toluidine. L'activité apoptotique a été exprimée en pourcentage de cellules apoptotiques (rapporté au nombre d'hépatocytes) dans des régions sélectionnées. Cinq champs de chaque lame colorée ont été analysés. Le comptage de l'apoptose a été effectué avec le logiciel de l'image J en utilisant une sélection de cellules immunomarquées pour la caspase-3 activée, une détermination des cellules totales et marquées par le compteur de cellules de l'image J et un calcul ultérieur des rapports entre les cellules marquées et les cellules hépatiques totales.

### **Autophagie, rapports LC3II/actine et p62/actine**

La LC3II et l'actine ont été dosées par Western blot. Après décongélation de -80°C, les biopsies du foie ont été pesées et les concentrations de protéines déterminées pour charger les gels de Western blot avec des quantités similaires de protéines. La biopsie a été broyée dans un micro-flacon contenant un inhibiteur de protéase (mini-pellets sans EDTA, Roche, Bâle, Suisse), du PBS et de la matrice de lyse D (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Il a été dilué dans un

tampon Laemmli (Tris 60 mM pH 6,8, 10% de glycérol, 0,01% de bleu de bromophénol, 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 2% de SDS) pour rompre les liaisons disulfures et charger négativement les protéines pour permettre leur séparation en fonction de la taille. Un microlitre de Benzonase (Novagen, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA) a été ajouté. Les échantillons ont été chauffés pour dénaturer les protéines, chargés dans des puits d'un gel de polyacrylamide/bisacrylamide à 10% (PAGEr™ EX Gels, Lonza, Rockland, ME USA) immergé dans un tampon de migration ProSieve™ Ex (Lonza, Rockland, ME, USA) et soumis à 100 volts pendant 10 minutes, et 150 volts jusqu'à la migration complète des marqueurs. Le gel a été transféré sur la membrane en utilisant un tampon de transfert (25mM Tris pH 7,6, 192 mM Glycine, 0,03% SDS, 20% méthanol) sous 100 Volts pendant 2h à 4°C, en vérifiant le transfert complet des protéines avec le rouge Ponceau. La membrane a été incubée pendant 1 h dans du TBST + 5% de lait à température ambiante avant d'être incubée avec un anticorps primaire LC3B de lapin à la dilution 1 :1000 (# 2775, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) à 4° C pendant la nuit. Pour la détection de LC3BII, un anticorps secondaire couplé à l'HRP (Promega, Madison, WI USA) a été ajouté pendant 40 minutes à température ambiante et la lecture s'est faite en chemiluminescence après révélation grâce au substrat de l'enzyme Western Lighting plus ECL (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Pour la détection de p62, un anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé à l'IRDye 680 (Anti-p62/SQSTM1 Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63103, USA 1:15000) a été ajouté pendant 1 heure à température ambiante et la lecture s'est faite en infra rouge sur le LI-COR (ODYSSEY®FC, Lincoln, NE, USA) dans le canal 700. Les niveaux d'actine ont été mesurés par chemiluminescence à l'aide d'un anti-actine de souris (1:50 000, anticorps monoclonal Anti- $\beta$ -Actin-Peroxidase, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). Les rapports LC3II/actine et p62/actine ont été calculés à partir des déterminations respectives des protéines.

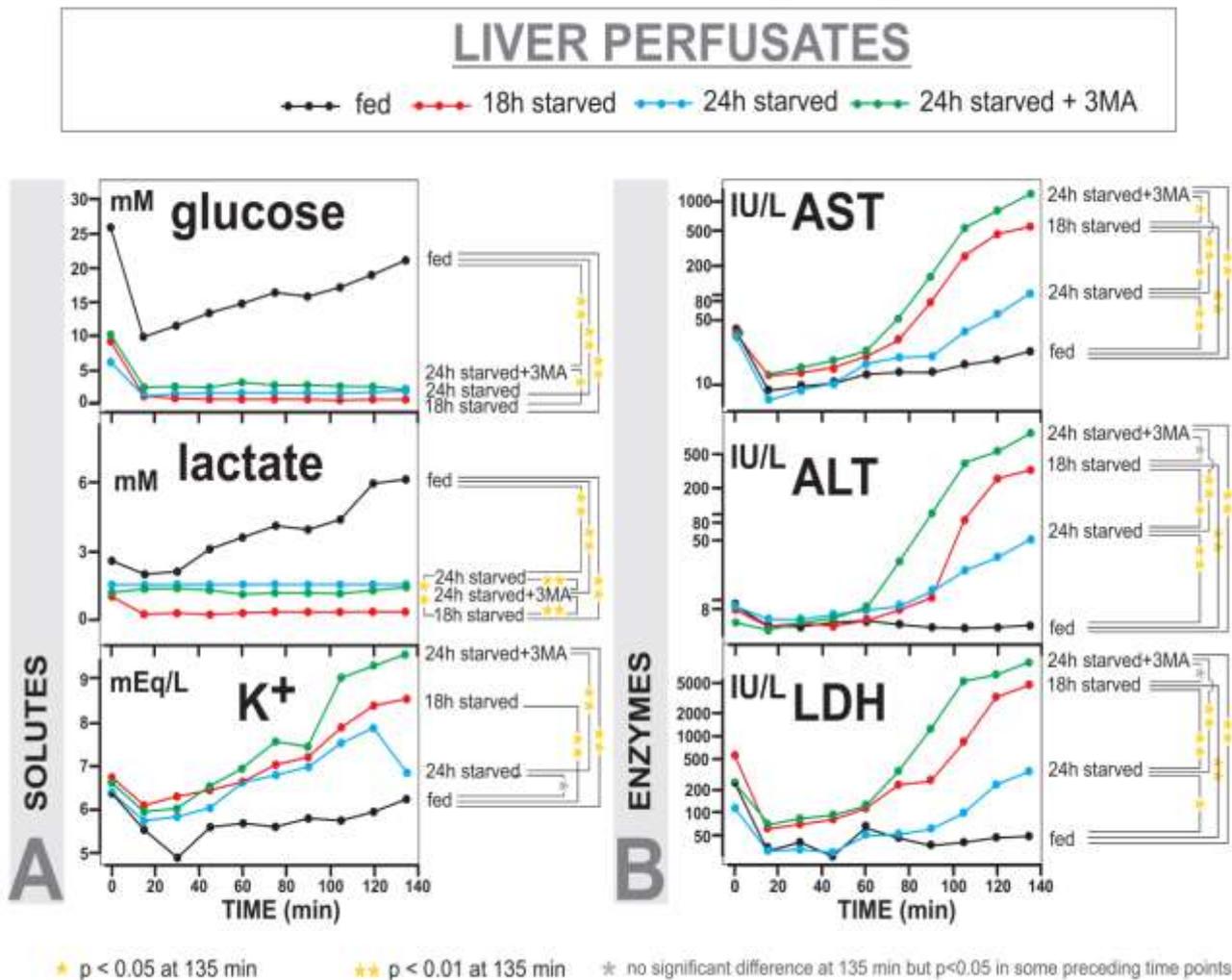
### Méthodes statistiques

Les résultats des métabolites et enzymes ont été exprimés en moyenne et en écart-type (SD). Les valeurs d'enzymes ont subi une transformation logarithmique pour normaliser leur distribution et homogénéiser leurs variances. L'impact des conditions expérimentales sur leur évolution pendant la perfusion de 135 min a été testé par la méthode de Zerbe pour les courbes de réponse, qui permet de comparer les groupes à chaque point temporel et sur n'importe quel intervalle de temps. Pour la teneur en glycogène et les ratios, les données ont été exprimées sous forme de boxplots (médiane et intervalle interquartiles). Les changements entre T0 et T135 ont été évalués par le test de rang signé Wilcoxon, tandis que le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les comparaisons entre les groupes. Les calculs et les graphiques ont été effectués à l'aide des logiciels statistiques SAS (version 9.4) et R (version 3.2.2). La signification a été considérée au niveau critique de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### Résultats

#### Les solutés hépatiques dans le perfusat

La **figure 6.3.1A** illustre les changements, en fonction du temps, des solutés de perfusat dans les quatre groupes expérimentaux. Les concentrations de glucose dans le perfusat du groupe de rats nourris étaient systématiquement plus élevées ( $p < 0,0001$ ) que dans les groupes à jeun 18h, 24h et 24h+3MA et de même pour les valeurs de lactate. Les concentrations de glucose et de lactate étaient également significativement plus faibles ( $p < 0,0001$ ) dans le groupe à jeun 18 heures que dans les deux groupes à jeun 24 heures. Les concentrations de potassium dans le groupe nourri étaient significativement plus faibles que dans les groupes à jeun 18h ( $p < 0,05$ ) et 24h+3MA ( $p < 0,001$ ) après 90 min et 60 min de perfusion, respectivement. Elles étaient également plus faibles dans le groupe à jeun 24h que dans le groupe à jeun 24h+3MA après 75 min ( $p < 0,01$ ).



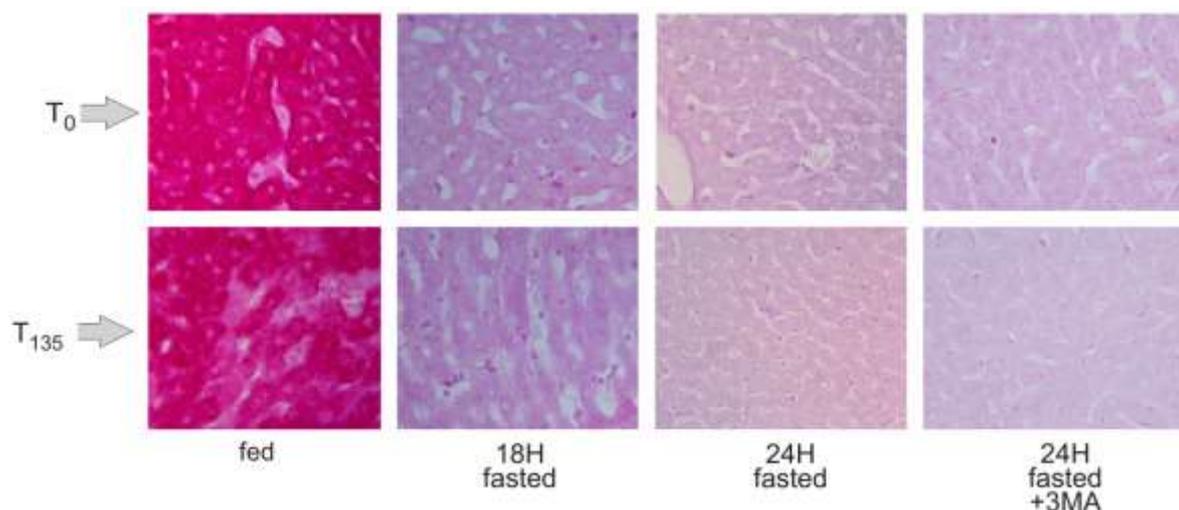
**Fig. 6.3.1.** Marqueurs de perfusion de foies de rats *ex-vivo* dans des groupes de rats nourris, à jeun 18h, 24h et 24h+3MA. Les concentrations des solutés dans le perfusat (A) et les concentrations des enzymes hépatiques dans le perfusat (B) au cours du temps sont exprimées en échelle normale et logarithmique, respectivement, avec des différences statistiques significatives entre les groupes de foie pour les valeurs au point temporel de 135 min. Abréviations : 3MA, 3-méthyladénine ; AST, aspartate transaminase ; ALT, alanine transaminase ; LDH, lactate déshydrogénase. Notez que contrairement à toutes les autres échelles d'ordonnées qui partent du zéro, l'échelle d'ordonnées du kalium dans le perfusat commence à une valeur de 5 mEq/L.

#### Les enzymes hépatiques dans le perfusat

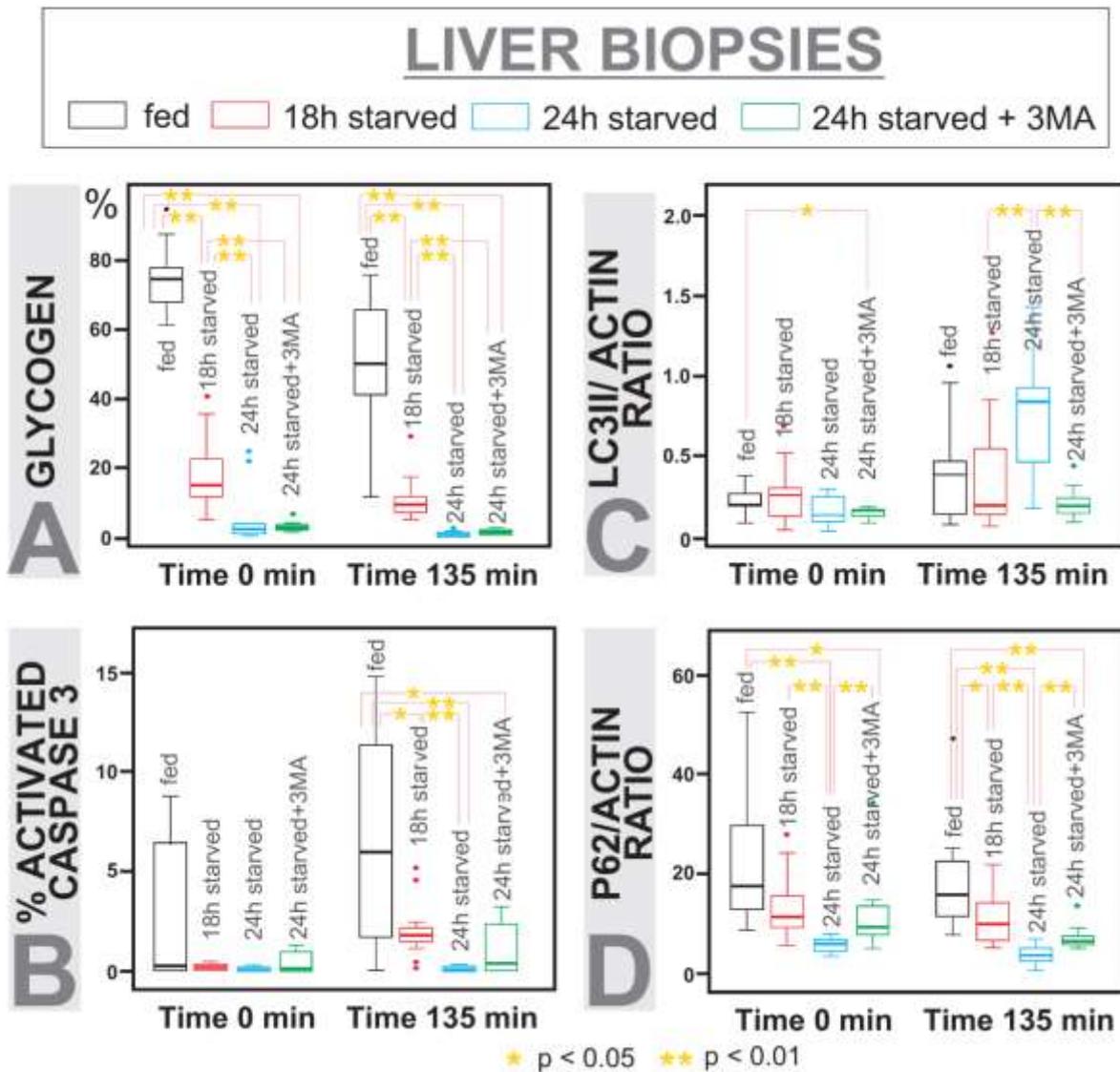
La libération d'enzymes hépatiques dans les échantillons de perfusat sont illustrés à la **figure 6.3.1B**. Les valeurs statistiquement significatives sont représentées pour chaque groupe à 135 minutes. Cependant, si l'on considère la cinétique de la libération d'enzymes, il existe également des différences significatives observées entre 60 et 120 minutes sur la période de perfusion. Les niveaux d'enzymes dans le groupe à jeun 24h sont intermédiaires entre ceux des groupes nourris et des groupes à jeun 18 heures, et la libération des enzymes hépatiques est la plus élevée dans le groupe à jeun 24h+3MA. Ainsi, les valeurs d'AST étaient significativement plus faibles dans le groupe nourri que dans les trois autres groupes ( $p < 0,001$ ). L'AST dans le groupe à jeun 24h était significativement plus faible que dans les groupes à jeun 24h+3MA ( $p < 0,001$ ) et à jeun 18h ( $p < 0,05$ ). Après 90 min de perfusion, les courbes d'AST étaient les plus élevées dans le groupe à jeun 24h+3MA et les plus basses dans le groupe nourri ; les valeurs intermédiaires étaient toutefois plus élevées dans les groupes à jeun 18h que dans le groupe à jeun 24h ( $p = 0,025$ ). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'ALT. À la fin de la perfusion, les activités d'ALT dans les groupes à jeun 18h et à jeun 24h+3MA n'étaient pas significativement différentes, ces deux groupes ayant des niveaux d'ALT dans le perfusat plus élevés que le groupe à jeun 24h. Les valeurs de LDH différaient entre les quatre groupes après 45 min de perfusion. Elles se sont avérées systématiquement plus faibles dans le groupe nourri que dans les groupes 18h ( $p = 0,014$ ) et 24h à jeun+3MA ( $p = 0,0001$ ), mais pas dans le groupe 24h à jeun. Les valeurs de LDH dans les groupes à jeun 18h et 24h +3MA étaient similaires et significativement plus élevées que dans le groupe à jeun 24h.

### Taux de glycogène des biopsies hépatiques

Au départ, les teneurs en glycogène du foie différaient sensiblement entre chaque groupe, sauf entre 24h à jeun et 24h à jeun+3MA (**Fig. 6.3.2 et Fig. 6.3.3A**). Pendant la perfusion, le taux de glycogène a diminué de manière significative dans tous les groupes. À 135 min, la teneur en glycogène était encore plus élevée dans le groupe nourri que dans le groupe à jeun 18h ( $p < 0,0001$ ), ce dernier groupe présentant une teneur en glycogène plus élevée que dans les deux groupes à jeun 24h ( $p < 0,0001$ ). La teneur en glycogène était plus faible dans le groupe à jeun 24h en comparaison au groupe à jeun 24h+3MA ( $p = 0,014$ ).



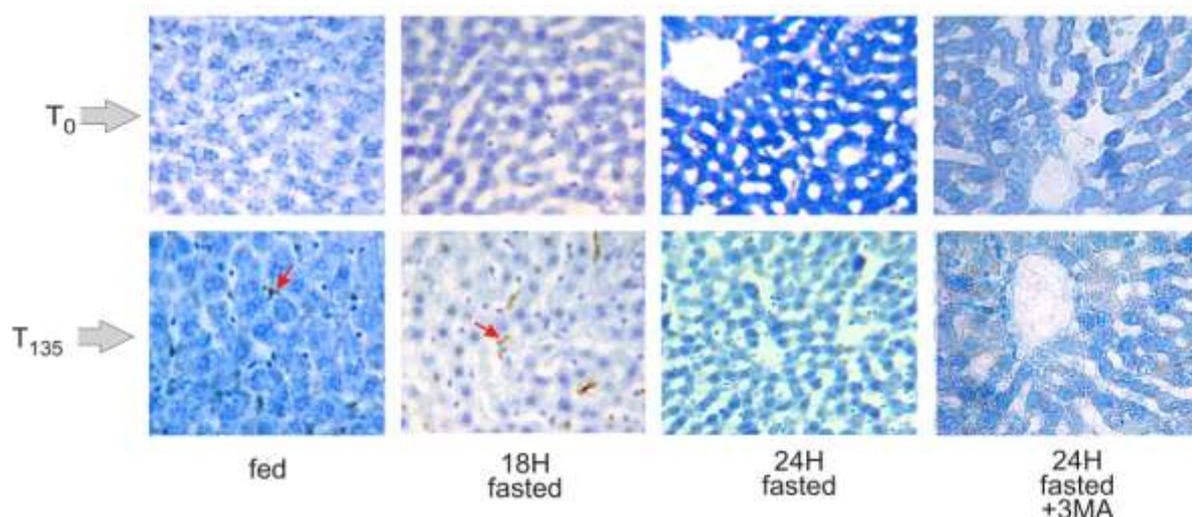
**Fig.6.3.2** – Lames histologiques de foie colorées au PAS aux temps 0 min (T0) et 135 min (T135) dans des groupes nourris, à jeun 18 h, à jeun 24 h et à jeun 24 h + 3MA. La figure compare et illustre, pour un animal de chaque groupe nutritionnel, la coloration PAS au début et à la fin des perfusions hépatiques. L'abondance du glycogène est proportionnelle à la composante rouge de la coloration PAS. Comme mentionné dans la section Matériels et méthodes, les tranches colorées par le PAS ont été traitées pour la détermination de la teneur en glycogène dans les hépatocytes à deux moments, c'est-à-dire 0 et 135 min, en utilisant le logiciel Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Les valeurs d'intensité de coloration déterminées par les nuances de gris sur l'ensemble des groupes expérimentaux sont également prises en compte par les représentations en boxplot figurant sur la figure 6.3.3 du panneau A.



**Fig. 6.3.3.** Marqueurs hépatiques de foies de rats *ex-vivo* dans les groupes nourris, à jeun 18h, à jeun 24h et à jeun 24h+3MA. Les boxplots tiennent compte de la teneur en glycogène (A), de la caspase-3 activée pour l'apoptose (B), des rapports LC3II/actine (C) p62/actine (D) spécifiques à l'autophagie. Des différences statistiques significatives entre les groupes de foie sont données pour des valeurs à 0 min et à 135 min. Abréviations : 3MA, 3-méthyladénine.

#### Apoptose du foie

Des coupes immunohistochimiques de foie marquées à la caspase-3 activée à temps 0 min (T0) et à 135 min (T135) dans des groupes nourris, à jeun 18 h, à jeun 24 h et à jeun 24 h + 3MA sont présentées à la **figure 6.3.4**. L'activité apoptotique, mesurée par le pourcentage de caspase-3 activée, était la même dans tous les groupes au départ (**Fig. 6.3.3B**). À la fin de la perfusion, elle différait entre tous les groupes, sauf si l'on compare les groupes à jeun 24h+3MA avec les groupes à jeun 18h et 24h (**Fig. 6.3.3B**).



**Fig. 6.3.4** – Lames histologiques de foie marquées pour la caspase-3 activée aux temps 0 min (T<sub>0</sub>) et 135 min (T<sub>135</sub>) dans les groupes nourris, à jeun 18h, à jeun 24h et à jeun 24h + 3MA. La figure compare et illustre, pour un animal de chaque groupe nutritionnel, l'immunomarquage au début et à la fin des perfusions hépatiques. La flèche rouge apparaissant sur 2 photomicrographies, à savoir celles à 135 min pour les deux groupes (nourri et à jeun 18h), indique l'une des cellules immunomarquées visibles sur ces photomicrographies du foie. L'immunomarquage est indiqué par la coloration brune visible sur les photomicrographies (la contre-coloration étant obtenue par le bleu de toluidine). Comme mentionné dans la section Matériels et méthodes, le comptage de l'apoptose a été effectué avec le logiciel de l'image J en utilisant une sélection de cellules immunomarquées pour la caspase-3 activée, une détermination des cellules totales et marquées par le compteur de cellules de l'image J et un calcul ultérieur des rapports entre les cellules marquées et les cellules hépatiques totales. Ces valeurs de comptage déterminées sur l'ensemble des groupes expérimentaux sont prises en compte par les représentations de boxplots apparaissant sur la figure 6.3.3 du panneau B.

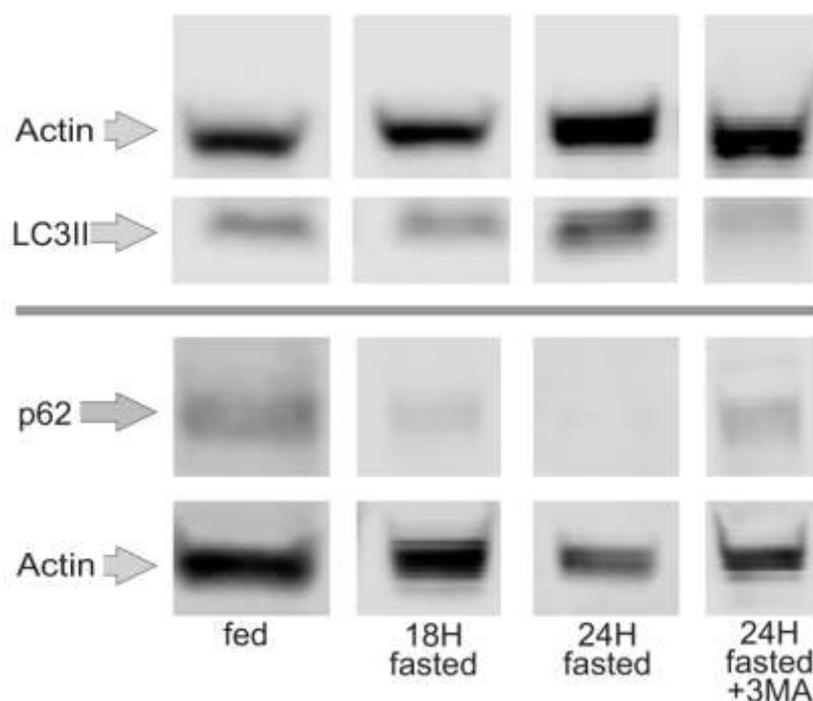
#### Autophagie du foie

##### Rapport LC3 II/actine

Le rapport LC3II/actine était similaire dans tous les groupes au départ, mais après 135 min de perfusion, il était significativement plus élevé dans le groupe à jeun 24h en comparaison aux groupes à jeun 18h et à jeun 24h+3MA, respectivement. Pendant la perfusion, les valeurs LC3II/actine ont augmenté de manière significative dans le groupe à jeun 24h, mais sont restées inchangées dans les autres groupes. L'augmentation de l'autophagie a été essentiellement perdue sous 3MA (**Fig. 6.3.3C**). La **Fig. 6.3.5** visualise les bandes de western blot de LC3II et d'actine dans les foies après 135 min de perfusion *ex-vivo* dans les groupes nourris, à jeun 18h, à jeun 24h et à jeun 24h + 3MA.

##### Rapport p62/actine

La **figure 6.3.5** visualise également les bandes de Western blot de p62 (avec l'actine) dans les différents groupes. Comme le montrent les représentations de boxplots figurant dans le panneau de la **Fig. 6.3.3D**, le rapport p62/actine différait sensiblement entre les groupes au départ, étant plus élevé dans le groupe nourri que dans les groupes jeun 24h et jeun 24h+3MA et plus faible dans le groupe jeun 24h que dans les groupes jeun 18h et jeun 24h+3MA. Pendant la perfusion, il a diminué dans les groupes à jeun 18 heures et 24 heures, mais pas dans les groupes nourris et les groupes à jeun 24h+3MA (**Fig. 6.3.3D**). À 135 min, le rapport p62/actine dans le groupe nourri était encore plus élevé que dans les autres groupes. Il est intéressant de noter qu'il était également plus élevé dans le groupe jeun 18 heures que dans les groupes jeun 24 heures et jeun 24 heures + 3MA.



**Fig.6.3.5** - Bandes de Western blot des protéines autophagiques LC3II et p62 et de l'actine dans le foie après 135 min de perfusion *ex-vivo* dans des groupes nourris, à jeun 18h, à jeun 24h et à jeun 24h + 3MA. La figure compare et illustre pour un animal de chaque groupe nutritionnel, deux passages séparés ont été effectués pour évaluer les marqueurs d'autophagie : un passage pour LC3II et un passage séparé pour p62, chacun de ces passages étant également évalué pour la teneur en actine. La LC3II et la p62, ainsi que l'actine associée à chacune de ces analyses ont été quantifiées par le logiciel LI-COR dans des zones sélectionnées. Les données générées par le LI-COR sont hautement reproductibles et ne dépendent pas de l'opérateur et de l'exposition à la lumière des bandes. Les données du LI-COR ont été utilisées pour les représentations des boxplots apparaissant dans les panneaux C et D de la Fig.6.3.3.

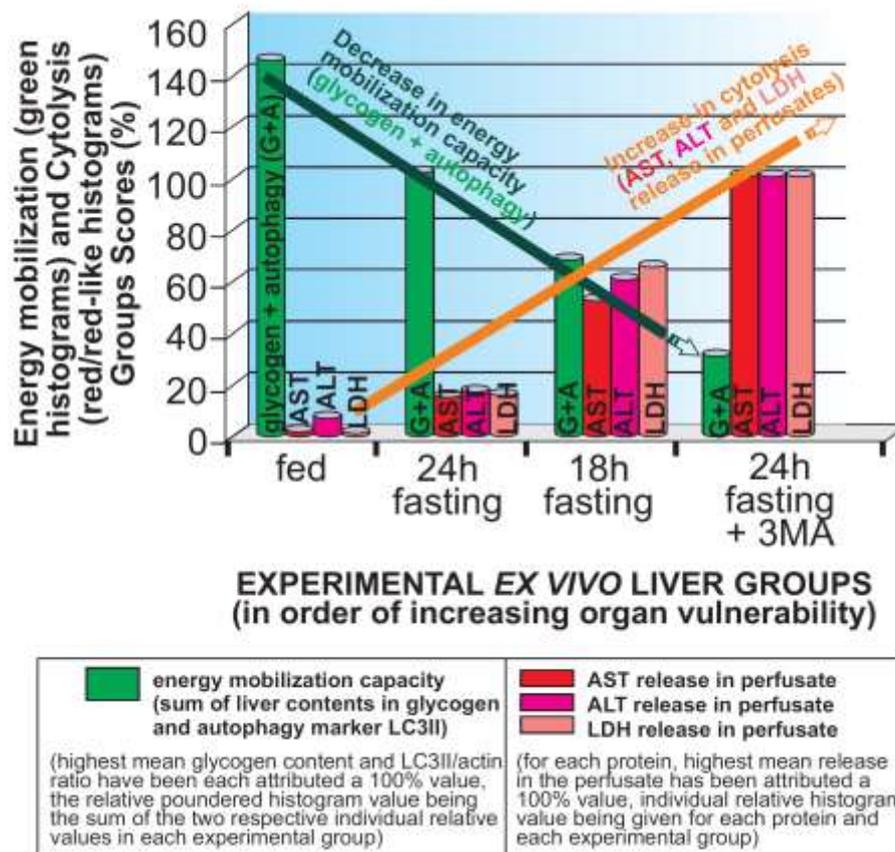
## Discussion

Dans les foies perfusés *ex-vivo*, il a été suggéré précédemment que les mécanismes de protection exigeaient que la disponibilité énergétique soit supérieure à un seuil critique [1]. Dans le présent travail, l'induction de l'autophagie a été attestée par une augmentation du rapport LC3II/actine et une baisse du rapport p62/actine, qui représentent respectivement des marqueurs très spécifiques [1] et moins spécifiques de l'autophagie [10-12]. Elle a été observée lors de la transition de 18h à 24h de jeûne et protège contre l'exacerbation de la vulnérabilité du foie liée au jeûne. Dans les groupes à jeun, le lien entre la protection contre la cytolysse et l'augmentation de l'autophagie est plus fort et plus cohérent que le lien entre la protection et la réduction de l'apoptose. Après 135 minutes de perfusion sans substrat énergétique, la cytolysse était significativement plus faible et l'autophagie plus élevée dans le groupe à jeun 24h par rapport aux groupes à jeun 24h+3MA et à jeun 18h. De plus, une relation inverse entre la cytolysse et les sources d'énergie disponibles (glycogène + autophagie) apparaît clairement lors de la comparaison des quatre groupes expérimentaux. Comme l'illustre la **figure 6.3.6**, le lien inverse entre l'autophagie et la cytolysse est mis en évidence de manière adéquate lorsque l'on considère que l'autophagie participe, avec les réserves de glycogène, aux capacités de mobilisation de l'énergie cellulaire.

Comme le foie *ex-vivo* est déconnecté des substrats énergétiques en circulation et qu'il est perfusé sans substrats énergétiques, le glycogène représente une source énergétique majeure. Ce dernier est de loin plus faible dans les foies à jeun que dans les foies nourris (**Fig. 6.3.3A**). L'autophagie, connue pour fournir aux cellules des substrats énergétiques [15], compenserait les réserves limitées de glycogène et protégerait contre la réduction des réserves d'énergie. Plus la capacité de mobilisation de l'énergie est élevée, plus la cytolysse est faible (**Fig. 6.3.6**). En conséquence, l'inclusion de 3MA dans la perfusion a réduit l'activité autophagique (**Fig. 6.3.3 C et D**) ; elle a conduit à une cytolysse accrue (**Fig. 6.3.1B**) et donc à la perte du bénéfice donné par le jeûne 24 h si on le compare au jeûne 18 h des rats, ce qui souligne que l'autophagie exerce un effet protecteur.

Un facteur déterminant dans l'interprétation des changements des niveaux de métabolites libérés, en particulier le lactate, est la déconnexion des foies *ex-vivo* de la circulation, différenciant donc les foies *ex-vivo* et *in situ*. Pour le foie *in situ*, la libération de lactate en circulation est principalement originaire de la glycolyse anaérobie extra-hépatique via le cycle de Cori [16]. Pour les foies perfusés *ex-vivo*, la libération de lactate dans le perfusat, bien que virtuellement issue de la glycolyse anaérobie par les cellules extra-hépatocytaires (Kupffer, vasculaires, canalaies, etc.) explique principalement la gluconéogenèse des hépatocytes. En effet, en raison de l'absence d'inclusion du glucose dans la perfusion et de sa déconnexion de la circulation, la principale source de glucose dont le lactate peut provenir est donc la gluconéogenèse hépatocytaire. En retour, la production de lactate dépend des taux de glycolyse extra-hépatocytaire, le lactate pouvant alors réalimenter la gluconéogenèse hépatocytaire. Bien que cela puisse sembler paradoxal, une production de glucose plus élevée dans des conditions d'alimentation par rapport au jeûne indique des réserves de glycogène plus importantes [17]. Par conséquent, la libération de lactate est plus importante dans les foies nourris que dans les foies à jeun (**Fig. 6.3.1A**). En ce qui concerne les foies à jeun, des niveaux de lactate plus élevés après 24 heures par rapport à 18 heures de jeûne pourraient s'expliquer par une gluconéogenèse hépatocytaire de fond plus élevée, peut-être en raison d'une exposition *in vivo* plus longue au glucagon qui, contrairement à l'insuline, un inhibiteur de l'autophagie [18], favorise l'autophagie [19]. Ce taux de lactate plus élevé des foies de rats à jeun 24 heures contre à jeun 18 heures n'est pas affecté par l'inclusion de 3MA dans la perfusion, ce qui suggère un effet faible ou nul de ce composé sur la gluconéogenèse. Des taux de gluconéogenèse plus élevés dans les deux groupes à 24 heures par rapport au groupe à 18 heures à jeun pourraient être dus à la consommation de glycogène, ce qui explique pourquoi la teneur en glycogène a été significativement réduite dans le premier groupe par rapport au second. La baisse significative observée entre les teneurs hépatiques en glycogène des premiers groupes (24h à jeun vs 24h à jeun + 3MA) n'est cependant que très modérée et pourrait être expliquée par l'autophagie du glycogène, une forme spéciale d'autophagie appelée glycophagie [20] et très probablement éliminée par inhibition de l'autophagie par la 3MA.

Pris dans leur ensemble, les mécanismes de protection observés sont décrits par la **figure 6.3.6**. En raison de l'utilisation actuelle d'animaux femelles, leur potentialisation par la signalisation des oestrogènes ne peut être exclue. Depuis le travail de pionnier de de Duve, une attention croissante a été consacrée au rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire programmée et la survie optionnelle grâce à des travaux expérimentaux bien conçus [21-23]. Parallèlement, la pertinence clinique de l'autophagie a également émergé dans des domaines médicaux tels que la chirurgie et l'oncologie. Récemment, la valeur pronostique du marqueur autophagique LC3 a été mise en évidence dans deux cohortes de patients subissant une résection du foie pour traitement chirurgical d'un carcinome hépatocellulaire [24]. À cet égard, la régénération du foie après des résections prolongées à la suite de thérapies néoadjuvantes représente une question cruciale où la tolérance ischémique et le volume résiduel sont d'un intérêt majeur. À la lumière des travaux actuels, ces développements expérimentaux et médicaux pourraient également souligner l'intérêt de promouvoir les voies cellulaires impliquées dans la mobilisation de l'énergie pour déclencher des effets de protection et de survie.



**Fig. 6.3.6.** Capacité de mobilisation de l'énergie vs cytolysé dans les foies *ex-vivo* après exposition à une perfusion sans substrat énergétique durant 135 min. La capacité de mobilisation de l'énergie dans un foie perfusé *ex-vivo* est essentiellement expliquée par la somme des réserves de glycogène et l'activité autophagique (évaluée par le rapport LC3II/actine) dans les biopsies hépatiques (Fig. 6.3.3A et 3C, respectivement). La cytolysé est expliquée par les rejets d'AST, d'ALT et de LDH dans les perfusats (Fig. 6.3.1B). Les niveaux moyens relatifs de la capacité de mobilisation de l'énergie et des protéines libérées dans les perfusats sont exprimés en pourcentage, la valeur moyenne de 100 % se référant au niveau le plus élevé dans les groupes expérimentaux. En conséquence, une valeur moyenne de 100 % a été attribuée au glycogène des foies nourris, au rapport LC3II/actine du marqueur d'autophagie des foies de rats à jeun 24 heures, et aux rejets d'AST, d'ALT et de LDH des foies de rats à jeun 24 heures + 3MA. Pour le rejet de protéines dans le perfusate, les trois pourcentages calculés sont représentés individuellement (histogrammes rouge et teintes de rouge). Pour la capacité de mobilisation de l'énergie (histogrammes verts), les pourcentages calculés du glycogène et du rapport LC3II/actine ont été additionnés (le pourcentage peut donc dépasser 100). La relation inverse entre la capacité de mobilisation de l'énergie et la cytolysé explique essentiellement les rôles protecteurs des réserves de glycogène dans des conditions d'alimentation et de l'activité autophagique dans des conditions de jeûne.

## Bibliographie

- (1) Papegay B, Stadler M, Nuyens V, Kruys V, Boogaerts JG, Vamecq J. Short fasting does not protect perfused ex vivo rat liver against ischemia-reperfusion. On the importance of a minimal cell energy charge. *Nutrition* 2017; 35:21–7.
- (2) Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366:177–96.
- (3) Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 2015; 22:367–76.
- (4) Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol* 2016; 37:8471–86.
- (5) Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; 121:671–4.
- (6) He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43:67–93.
- (7) Stipanuk MH. Macroautophagy and its role in nutrient homeostasis. *Nutr Rev* 2009; 67:677–89.
- (8) Stadler M, Nuyens V, Seidel L, Albert A, Boogaerts JG. Effect of nutritional status on oxidative stress in an ex vivo perfused rat liver. *Anesthesiology* 2005;103: 978–86.
- (9) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770–6.
- (10) Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010; 221:117–24.
- (11) Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Third edition. *Autophagy* 2016; 12:1–222.
- (12) Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3:542–5.
- (13) Seglen PO, Gordon PB. 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:1889–92.
- (14) Stadler M, Nuyens V, Boogaerts JG. Intralipid minimizes hepatocytes injury after anoxia-reoxygenation in an ex vivo rat liver model. *Nutrition* 2007; 23: 53–61.
- (15) Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011; 13:495–504.
- (16) Cori CF. The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. *Curr Top Cell Regul* 1981; 18:377–87.
- (17) Hems DA, Whitton PD. Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol Rev* 1980; 60:1–50.
- (18) Paula-Gomes S, Gonçalves DAP, Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LCC, Kettelhut IC. Insulin suppresses atrophy- and autophagy-related genes in heart tissue and cardiomyocytes through AKT/FOXO signaling. *Horm Metab Res* 2013; 45:849–55.
- (19) Schworer CM, Mortimore GE. Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: Mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:3169–73.
- (20) Jiang S, Wells CD, Roach PJ. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;413:420–5.
- (21) De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 1966;28:435–92.
- (22) Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7 to deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169:425–34.
- (23) Mortimore GE, P€os€o AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* 1987; 7:539–64.
- (24) Lin CW, Lin CC, Lee PH, Lo GH, Hsieh PM, Koh KW, et al. The autophagy marker LC3 strongly predicts immediate mortality after surgical resection for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:91902–13.

## **6.4. Identification de la voie activatrice de l'autophagie**

Ce quatrième article du doctorat en cours de soumission explore et identifie les acteurs et voies de signalisation cellulaire (ADP et récepteur purinergique P2Y13) contribuant à la protection autophagique du foie isolé

### **4<sup>ème</sup> Article soumis: L'ADP et le récepteur P2Y13 sont impliqués dans la protection autophagique du foie *ex vivo* de rats à jeun - bénéfice potentiel pour la préservation du greffon hépatique**

#### **Résumé**

Les études sur la protection des foies perfusés *ex vivo* peuvent aider à concevoir l'hépatoprotection et les stratégies de préservation des greffes de foie. La protection des foies isolés de rats à jeun 24h versus 18h a été précédemment attribuée à l'autophagie qui contribue à la capacité de mobilisation énergétique *ex vivo*. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation de cette protection. Dans d'autres études expérimentales, 3 grandes voies de signalisation ont été prises en considération en raison de leur capacité à déclencher l'autophagie : HMGB1, AMPK et le récepteur purinergique P2Y13. À cette fin, des foies *ex vivo* isolés de rats à jeun ont été perfusés pendant 135 min, des échantillons de perfusat ont été étudiés pour la libération de protéines et des biopsies hépatiques pour la signalisation des protéines précédemment étudiées pour l'autophagie. Pour l'HMGB1, aucune différence n'est observée aux deux temps de perfusion dans les foies isolés de rat à jeun 18h et 24h. Cependant, bien qu'augmentant la forme phosphorylée de l'AMPK, la perfusion des foies de rat à jeun 18h avec l'AICAR 1mM, un activateur de l'AMPK, ne protège pas les foies *ex vivo*.

Le ratio ADP (et pas l'AMP) /AMP+ADP+ATP augmente dans les foies de rat à jeun 24h versus 18h. La perfusion des foies de rat à jeun 24h avec 0,1 mM de MRS2211, un antagoniste spécifique du récepteur P2Y13, induit une augmentation de la libération des marqueurs de cytolyse dans le perfusat et une chute des marqueurs de l'autophagie LC3II/actine (associée à la perte de diminution du rapport p62/actine) mettant en lumière une inhibition de l'autophagie et la perte de protection observée.

**Conclusions** : Le récepteur P2Y13 et l'ADP (un activateur physiologique de ce récepteur) est impliqué dans la protection des foies *ex vivo*. La voie purinergique pourrait agir en tant que voie de préservation des greffes de foie (et peut-être d'autres organes).

#### **Introduction**

La restriction alimentaire a prouvé ses avantages sur la santé et la maladie dans une grande variété de modèles expérimentaux [1]. Les avantages de cette approche dans la pratique préclinique et clinique ont fait l'objet d'études récentes mettant l'accent sur l'amélioration des maladies rénales [2], cardiovasculaires [3], neuroinflammatoires, neurodégénératives [4], le diabète [5], le vieillissement du cerveau [6], le stress chirurgical et la chimiothérapie [7], la durée de vie [8], l'épilepsie résistante aux médicaments [9] et les cancers du sein liés à l'obésité [10]. Un grand nombre de modalités de conception de la restriction alimentaire ont été décrites, allant de modifications qualitatives (par exemple, carence en acides aminés soufrés) [11] à des modifications quantitatives (c'est-à-dire carencées en calories) [12] du régime alimentaire [13]. La restriction alimentaire et le jeûne protègent contre les lésions expérimentales de plusieurs organes, dont le cerveau [14], le cœur [15], les reins [16] et le foie [17]. La privation de nourriture à court terme (24 heures) chez les rats a prouvé son efficacité protectrice lors de lésions hépatiques expérimentales in situ (IRI) [17]. En utilisant un modèle *ex vivo* au lieu d'un modèle in vivo d'organe, nous n'avons pas reproduit la protection observée in vivo et avons même induit une aggravation des lésions hépatiques par un jeûne préalable de 18 heures de l'animal [18]. De manière inattendue, une partie de la protection a été récupérée en amplifiant la durée de jeûne de 18 heures à 24 heures sans tout de même atteindre le niveau de protection observée par l'état nourri. [19] La protection relative du foie *ex vivo* par ce décalage de la période de jeûne rappelait la protection induite par le jeûne observé in vivo. Dans les deux effets protecteurs, l'autophagie s'est avérée être un élément clé [17,19]. Cependant, contrairement à l'expérimentation in vivo dans laquelle la protection du foie par un jeûne de 24 heures est observée

si on la compare à l'état nourri [17], dans le modèle de foie *ex vivo*, un jeûne de 24 heures, bien que protecteur par rapport à 18 heures, était moins protecteur que l'état nourri [19]. Ceci a été attribué à la dépendance étroite de la protection du foie isolé par les capacités de mobilisation énergétique (glycogène plus autophagie) montrées dans les différents états nutritionnels (nourri, 18h et 24h de jeûne) (foies isolés de rats nourris ayant les réserves énergétiques les plus élevées) [19], la protection étant alors favorisée par l'exposition des foies *ex vivo* de rats à jeun à des substrats énergétiques comprenant des lipides [20] et/ou des métabolites du pyruvate : l'alanine [21] et le lactate [22].

L'autophagie représente un processus adaptatif fascinant qui permet aux cellules de faire face à une variété de stress environnementaux. L'autophagie peut entraîner une mort cellulaire appelée autose [23], mais dans de nombreux cas, elle permet la survie des cellules grâce au maintien d'un contrôle de qualité efficace des protéines et des organelles et à l'apport de substrats énergétiques provenant de la dégradation lysosomale des composants cellulaires autophagosomiques [24]. L'autophagie est un processus hautement régulé [25] à la croisée des chemins et en interaction avec plusieurs autres voies de signalisation cellulaire [26,27]. En ce qui concerne le foie, l'autophagie a été décrite comme conférant une protection dans plusieurs cas, y compris pour diverses lésions, parmi lesquelles l'exposition à l'éthanol, la septicémie et l'ischémie/reperfusion [28,29]. L'autophagie implique des autophagosomes pour englober les organites intracytoplasmiques et leur fusion avec les lysosomes pour la dégradation du contenu [24]. En cas de stress énergétique et en combinant la dégradation des composants intracellulaires avec la libération de substrats énergétiques (acides gras et acides aminés), elle améliore l'état énergétique des cellules [30]. La privation de nutriments active l'autophagie [31], ce qui peut empêcher la nécrose due à l'épuisement de l'énergie.

De manière non exhaustive, et en plus ou en interaction avec les récepteurs du facteur de croissance/axe PI3K-AKT [32], les déclencheurs de l'autophagie comprennent l'activation de l'AMPK, l'augmentation de l'HMGB1 intracellulaire et la signalisation purinergique. L'activation de l'AMPK est un facteur connu de développement de l'autophagie, qui peut inactiver directement et indirectement mTOR [33]. La déphosphorylation de mTOR entraîne celle d'Atg13 permettant à cette dernière de s'associer à l'ATG1, l'activité kinase de cette dernière s'active et permet la formation d'un complexe ATG1 opérationnel [24]. Le complexe ATG1 fonctionnel peut interagir avec le complexe PI3KIII/Bécline 1 pour initier la formation de la membrane autophagosomique et son élongation pour atteindre la formation de l'autophagosome [24]. L'HMGB1 intracellulaire peut également déclencher l'autophagie dans la santé et la maladie [34] en interagissant physiquement avec la protéine Bécline 1 (également appelée ATG6) et l'Atg5, protégeant ces protéines contre le clivage protéolytique médié par la calpaïne, et permettant le déclenchement de l'autophagie à différentes étapes de cette voie [35]. L'activation par l'ADP du récepteur P2Y13 purinergique de la membrane plasmique a également été impliquée dans le déclenchement de l'autophagie par l'inhibition de la signalisation AKT et la stimulation de la signalisation MAPK (JNK/P38 contribuant à promouvoir l'autophagie) [36], l'autophagie induite par le récepteur P2Y13 réduit la libération de lipase hépatique [37].

La régulation de trois déclencheurs (AMPK, HMGB1 et récepteur P2Y13) par le jeûne est clairement documentée pour deux d'entre eux : L'AMPK est largement connue comme senseur réagissant à l'état nutritionnel, qui est activé par le jeûne, les appauvrissements en nutriments et en énergie et permettant une boucle de rétroaction homéostatique dédiée à la préservation de la disponibilité et de la fourniture d'énergie [38]; l'incorporation accrue d'HMGB1 circulant par le foie suite à l'activation de la Sirtuine 1, contribue à sa protection contre l'IRI en cas de jeûne de 24 heures [17]. Le rôle de chacun des trois déclencheurs dans l'induction protectrice de l'autophagie et de la protection est ici étudié et discuté dans le cas particulier des foies *ex vivo* provenant de rats à jeun 18 et 24 heures, ainsi que la proportion de nucléotides adényliques sous forme d'ADP, l'agoniste des récepteurs P2Y13, dans ces foies.

## Méthodes

### Animaux

Des rats Wistar femelles achetés aux Laboratoires Charles River (Saint Germain Nuelles, France) avec un poids corporel de 200 g ont été acclimatés pendant au moins cinq jours à la température ambiante de 24-26°C avec un cycle lumière-obscurité de 12:12 h. La nourriture et l'eau de laboratoire standard ont été fournies *ad libitum*. Les rats ont été répartis au hasard dans des groupes nourris et à jeun (n ≥ 10 dans chaque groupe). Dans les expériences utilisant des animaux à jeun, la nourriture a été retirée 18 (groupe à jeun 18h) ou 24 (groupes à jeun 24h) heures avec un accès libre à l'eau avant de commencer la perfusion. Tous les animaux utilisés dans cette étude ont été soignés dans nos installations de recherche animale. Le modèle animal utilisé dans notre étude est bien documenté et visait à clarifier les mécanismes par lesquels diverses conditions de jeûne (qui sont cliniquement et inévitablement celles des patients sous anesthésie) affectent différemment l'intégrité du foie. L'intégrité du foie est nécessaire pour une issue favorable du patient

anesthésié et, dans un autre domaine, pour la préservation du greffon hépatique humain. Aucune souffrance n'a été causée aux animaux, l'ablation du foie étant effectuée sous anesthésie. Les évaluations des foies prélevés *ex vivo* ont permis d'éviter que les animaux vivants ne soient exposés à des produits toxiques et à des effets secondaires combinés (AICAR, MRS2211). Aucun événement indésirable important n'a ensuite été observé chez les animaux dans le cadre de notre protocole.

#### Déclaration éthique

Toutes les études sur les animaux ont été autorisées par le Comité d'utilisation et de révision des soins aux animaux de l'Université libre de Bruxelles (CEBEA-IBMM-2014-39).

#### Solutions et produits chimiques pour les perfusions hépatiques

Une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) sans albumine a été préparée comme décrite précédemment [19]. Dans certaines expériences, des composés ciblant la voie de signalisation étudiée ont été ajoutés au mélange HBSS aux concentrations indiquées dans la section des résultats et/ou des légendes de figures.

#### Hépatectomie et perfusion hépatique *ex vivo*

La procédure de perfusion du foie a été décrite ailleurs [20].

#### Protocole général pour les biopsies du foie et les prélèvements de perfusat

Les foies de rat ont été perfusés avec les solutions respectives d'HBSS durant 135 minutes. Les échantillons de perfusat et les biopsies de foie ont été prélevés selon la technique décrite précédemment [19].

#### Mesure des marqueurs de cytololyse et des métabolites dans les échantillons de perfusat

L'aspartate aminotransférase (AST, IU/L), l'alanine aminotransférase (ALT, IU/L), la lactate déshydrogénase (LDH, IU/L), le glucose (mg/dl), le lactate (mmol/L) et le potassium (mEq/L) ont été dosés dans des échantillons de perfusat, à différents moments, sur un Architect plus CI4100 (Abbott Diagnostics, IL, USA).

#### Mesure de la teneur en glycogène hépatique sur des biopsies du foie

La teneur en glycogène des hépatocytes a été établie à deux moments, c'est-à-dire 0 et 135 min, à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) tel que décrit précédemment [20].

#### Autophagie et mesures de LC3I et p62

Les marqueurs autophagiques LC3II (augmentation spécifique) et p62 (moins spécifique et décroissant par consommation sous autophagie) ont été mesurés dans les biopsies de foie comme décrit précédemment [19].

#### Mesure de l'AMPK totale et de l'AMPK phosphorylée

La même méthodologie que celle utilisée pour le dosage du LC3II et de p62 [19] a été utilisée pour le dosage de l'AMPK totale et l'AMPK phosphorylée. L'anticorps pour l'AMPK $\alpha$  totale (anticorps primaire AMPK $\alpha$  (D5A2# 5831, lapin 1:1000)) et l'anticorps pour l'AMPK $\alpha$  phosphorylée (anticorps primaire phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) (40H9#2535, lapin 1:1000)) provenant de chez Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) ont été révélés par chemiluminescence utilisant le Western lighting plus ECL (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) et ont été quantifiés à l'aide d'un système Odyssey FC (Li-cor). L'AMPK $\alpha$  totale et l'AMPK $\alpha$  phosphorylée ont été rapportés à l'actine afin de normaliser leur dosage.

#### Les nucléotides de l'adénosine

La séparation de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP a été effectuée par une chromatographie liquide à haute performance comme décrit précédemment [18].

### Mesure de l'HMGB1

Après décongélation à partir de -80°C, les biopsies de foie ont été pesées et les concentrations de protéines ont été déterminées par le kit Pierce BCA (Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo scientific, Waltham, MA, USA). L'HMGB1 a été déterminée par la technique ELISA en sandwich (Enzyme-linked immuno Sorbent Assay) utilisant le kit de dosage de l'HMGB1 pour le rat (Wuhan Fine Biotech Co, Ltd, Wuhan, Chine) en respectant les instructions. L'absorbance à 450 nm a été mesurée avec un lecteur de microplaques Emax Plus (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) et était proportionnelle aux concentrations d'HMGB1 [51-54].

### Méthodes statistiques

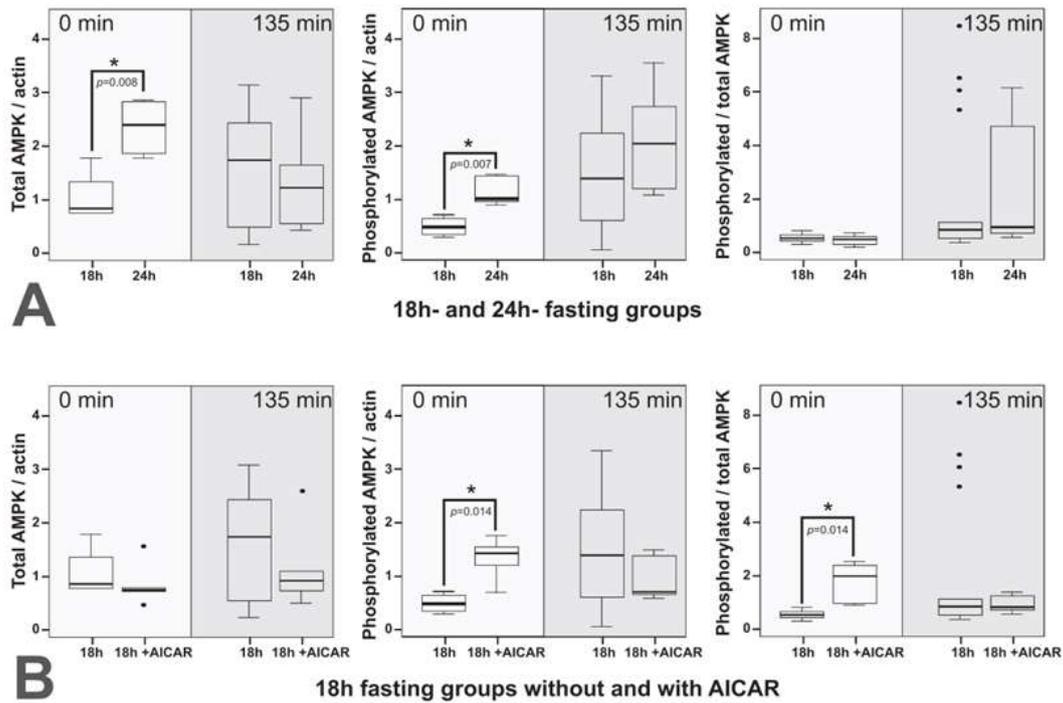
Les résultats ont été exprimés en termes de moyenne et d'écart-type (SD), de quartiles (Q1, médiane, Q3) et de fourchette (minimum, maximum) par temps et par groupe. Les données des biopsies ont été affichées par Boxplot par temps et par groupe. Pour les valeurs des marqueurs enzymatiques du perfusé et des métabolites, les points moyens ont été reportés graphiquement et leurs erreurs types (SE) ont été déterminées et commentées dans le texte. Les changements des paramètres entre T0 et T135 ont été évalués par le test des rangs signé de Wilcoxon. Les groupes ont été comparés par le test de Kruskal-Wallis. Pour certains paramètres (AST, ALT et LDH), une transformation logarithmique a été appliquée pour normaliser leur distribution. Les données censurées (c'est-à-dire < d, le seuil de détection du test) ont été remplacées par des valeurs générées de manière aléatoire entre 0 et d en utilisant la densité de probabilité triangulaire  $f(x) = 2x/d^2$  pour  $0 \leq x \leq d$ . Cela a permis de tracer des courbes lisses et d'éviter la perte d'observations et le problème des log-transformations sans avoir d'impact significatif sur les résultats finaux. Les évolutions temporelles des paramètres biologiques dans les différents groupes expérimentaux ont été comparées par la méthode non paramétrique de Zerbe pour les courbes réponse [39], mais également analysées par le modèle linéaire à effets mixtes (GLMM). Les résultats ont été jugés significatifs au niveau critique de 5 % ( $p < 0,05$ ). Les calculs ont été effectués avec les logiciels SAS (version 9.4) et R (version 3.2.2).

## Résultats et discussion

Les mécanismes par lesquels les foies *ex vivo* de rats à jeun 24 heures étaient mieux protégés que ceux de rats à jeun 18 heures durant la perfusion sans éléments énergétiques ont été étudiés en comparant les niveaux de déclencheurs potentiels de l'autophagie, processus cellulaire protecteur précédemment mis en évidence. [19] La modulation pharmacologique de ces déclencheurs ou des voies de signalisation associées a également été utilisée comme outil pour évaluer plus en détail leur rôle dans l'induction de l'autophagie et la protection des foies *ex vivo*.

### Etude du rôle de l'AMPK

L'AMPK totale et phosphorylée ont été comparées entre les groupes à jeun. Au temps 0, mais pas à 135 min, l'AMPK totale et phosphorylée était significativement plus élevée dans les foies de rats à jeun de 24 h par rapport à ceux de 18 h (valeurs p respectives : 0,011 et 0,031), les rapports entre l'AMPK phosphorylée et l'AMPK totale ne différaient pas entre les deux groupes à jeun. Cette augmentation de l'AMPK phosphorylée pourrait s'expliquer par une teneur en glycogène plus faible dans les foies de rat à jeun 24 h par rapport à ceux de 18 h et a été étudiée en parallèle dans des foies de rat à jeun 18 h perfusés avec 1 mM d'activateur de l'AMPK : l'AICAR [40] afin de tester si l'activation de cette voie pouvait assurer la protection des foies perfusés *ex vivo*. Les résultats de la comparaison des niveaux et des formes d'AMPK entre les groupes de foies de rat à jeun 18h et 24h ainsi que leur impact par l'activateur d'AMPK par l'AICAR sont illustrés dans la **figure 6.4.1**.



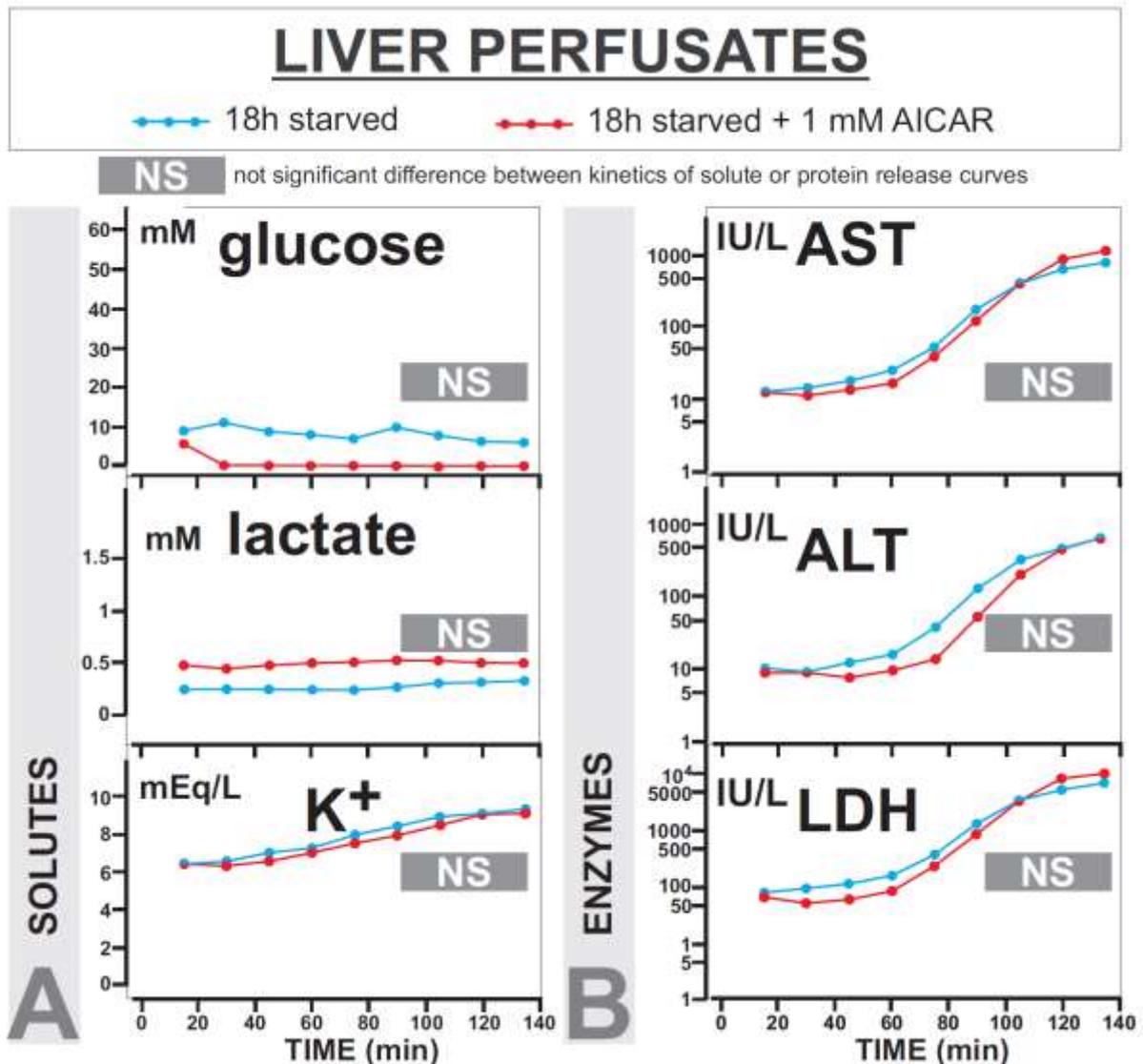
**Figure 6.4.1-** Effet des périodes de jeûne des animaux donneurs et de l'inclusion d'AICAR dans la perfusion sur le contenu hépatique en AMPK.

**A** - Evolution des quantités totales et phosphorylées d'AMPK et de leurs rapports combinés dans les groupes de foie de rat à jeun de 18h et 24h.

**B** - Changements induits par l'AICAR dans les quantités totales et phosphorylées d'AMPK et leurs ratios combinés dans les foies de rat à jeun de 18 h.

Les expériences ont été réalisées simultanément. Les résultats du même groupe de foies de rat à jeun 18 h sont illustrés dans les panneaux A et B. D'autres commentaires figurent dans le texte.

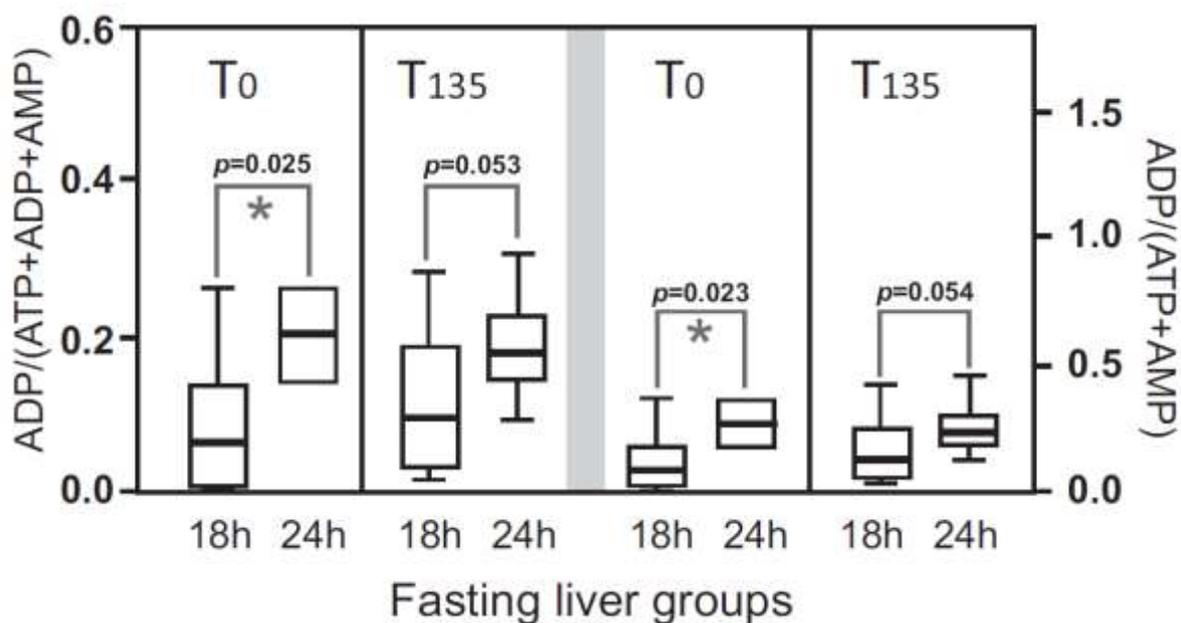
L'effet de l'AICAR sur les taux de cytolysse des foies a également été étudié. Les échantillons de perfusats provenant de foies traités par l'AICAR n'ont pas montré de différences significatives dans la libération de glucose et de lactate par rapport aux perfusats provenant de foies non traités par l'AICAR (**Figure 6.4.2A**). De même, aucune différence n'a été observée dans la libération de potassium et d'enzymes hépatiques, notamment l'AST, l'ALT et la LDH (**Figure 6.4.2B**), ce qui indique qu'il n'y a pas de protection détectable par l'AICAR contre la cytolysse du foie. Donc, en conclusion, bien que l'AICAR ait été capable d'augmenter la forme phosphorylée de l'AMPK, cet effet n'a pas été à l'origine d'une protection accrue des foies de rat perfusés *ex vivo*.



**Figure 6.4.2** - Effet de l'AICAR perfusé sur les métabolites (A) et les marqueurs de cytolysse (B) dans les foies de rat à jeun 18h. Aucun changement significatif n'a été réellement induit par l'AICAR dans les marqueurs de cytolysse (K<sup>+</sup>, AST, ALT et LDH), ce qui ne soutient pas la protection par l'AICAR de foies isolés de rats à jeun 18 h.

### Comparaison des ratios $ADP/(AMP+ADP+ATP)$ ou $ADP/(AMP+ATP)$

Les différences significatives mentionnées ci-dessus dans les formes d'AMPK entre les groupes de foie de rat à jeun 18h et 24h ont conduit à déterminer les proportions relatives de nucléotides adényliques dans ces foies. Dans le groupe à jeun 24 h en comparaison à celui à jeun 18 h, il n'y a pas de prépondérance des cofacteurs adényliques sous la forme d'AMP, dont on sait qu'elle active l'AMPK [38]. En revanche, l'ADP, également connu pour activer l'AMPK par un mécanisme distinct, s'est révélé relativement plus important. En effet, l'ADP, comparée à d'autres formes de cofacteurs adényliques exprimés comme la somme de (ATP+ADP+AMP) ou de (ATP+AMP), a indiqué une augmentation significative des rapports  $ADP/(ATP+ADP+AMP)$  et  $ADP/(ATP+AMP)$  dans les groupes de foie de rat à jeun de 24 heures par rapport au groupe de foies de rat à jeun 18 heures (**Figure 6.4.3**).

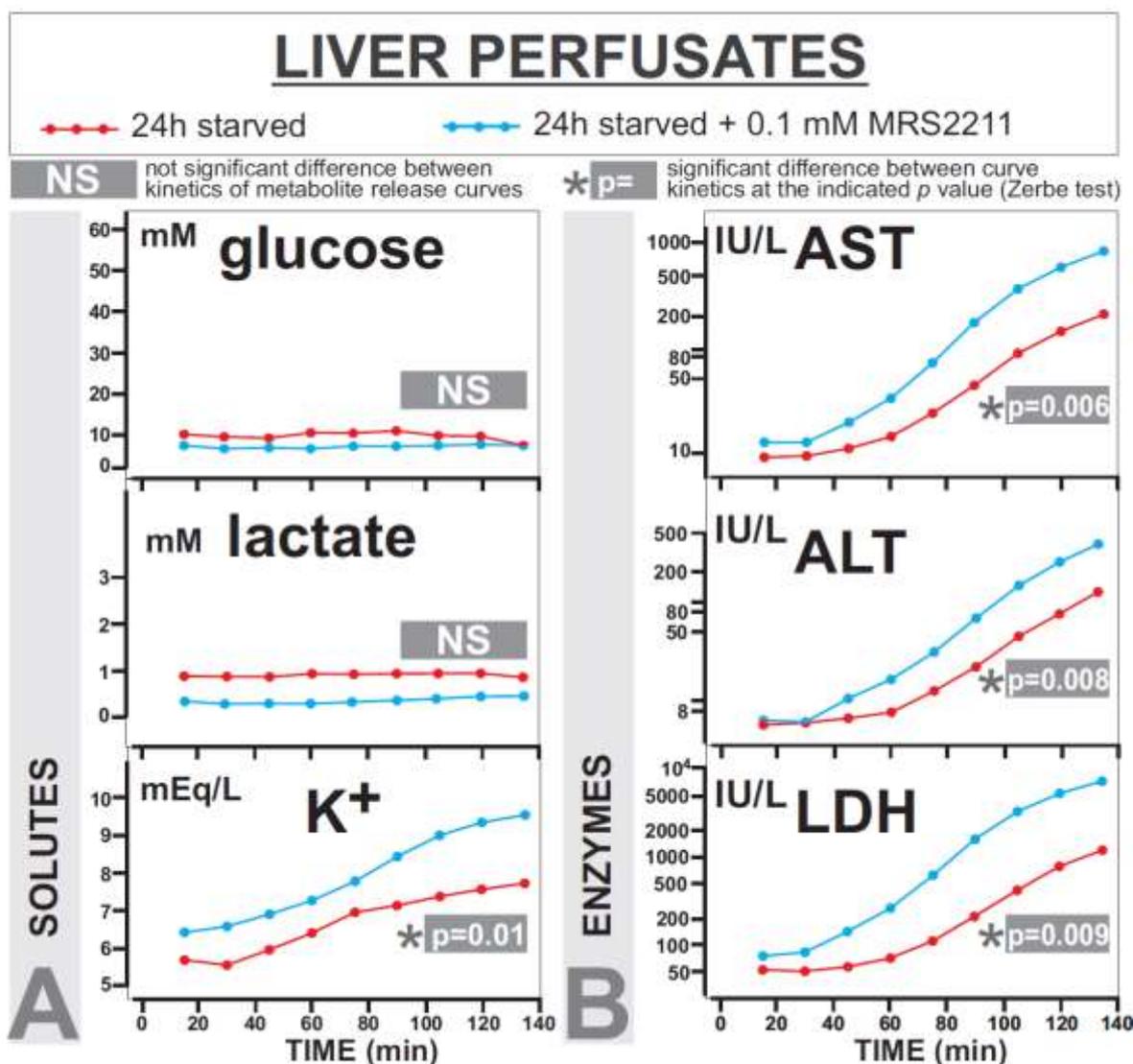


**Figure 6.4.3** - Comparaison de la proportion de cofacteurs adényliques des cellules hépatiques sous forme d'ADP dans les groupes de foie de rat à jeun 18h et 24h. On note une augmentation significative du pool relatif de nucléotides adényliques sous forme d'ADP au temps zéro dans le groupe de foie de rat à jeun 24 heures par rapport au groupe de foie de rat à jeun 18 heures. Notez également la tendance à maintenir cette augmentation à 135 minutes.

### **Effets de l'antagoniste du récepteur P2Y13 : le MRS2211 sur le taux de cytolysse et l'autophagie des foies de rat à jeun 24h**

Comme il a été démontré dans la littérature que l'ADP hépatique est un déclencheur de l'induction de l'autophagie par l'activation du récepteur P2Y13 [36,37], la proportion plus élevée d'ADP dans les groupes de foie de rat à jeun 24h a incité à examiner si le récepteur P2Y13 pouvait être impliqué dans la protection des foies de rat à jeun 24h. À cette fin, des foies isolés de rat à jeun 24 heures ont été perfusés avec 0,1 mM de MRS2211, un antagoniste spécifique de ce récepteur [41], afin d'observer si les taux relatifs de cytolysse et d'induction autophagique pouvaient être influencés.

Les marqueurs métaboliques et de cytolysse ont été déterminés dans des échantillons de perfusat provenant de foies de rat à jeun 24 heures exposés et non exposés au MRS2211 dans le perfusat. Bien qu'aucune modification significative n'ait été observée dans les métabolites glucose et lactate, la libération de potassium et des enzymes hépatiques dans les perfusats ont été significativement modifiés par l'inclusion du MRS2211 dans la perfusion, avec des augmentations significatives de la libération de potassium, d'AST, d'ALT et de LDH, ce qui atteste de l'augmentation des taux de cytolysse sous l'antagoniste du récepteur P2Y13 (Figure 6.4.4).

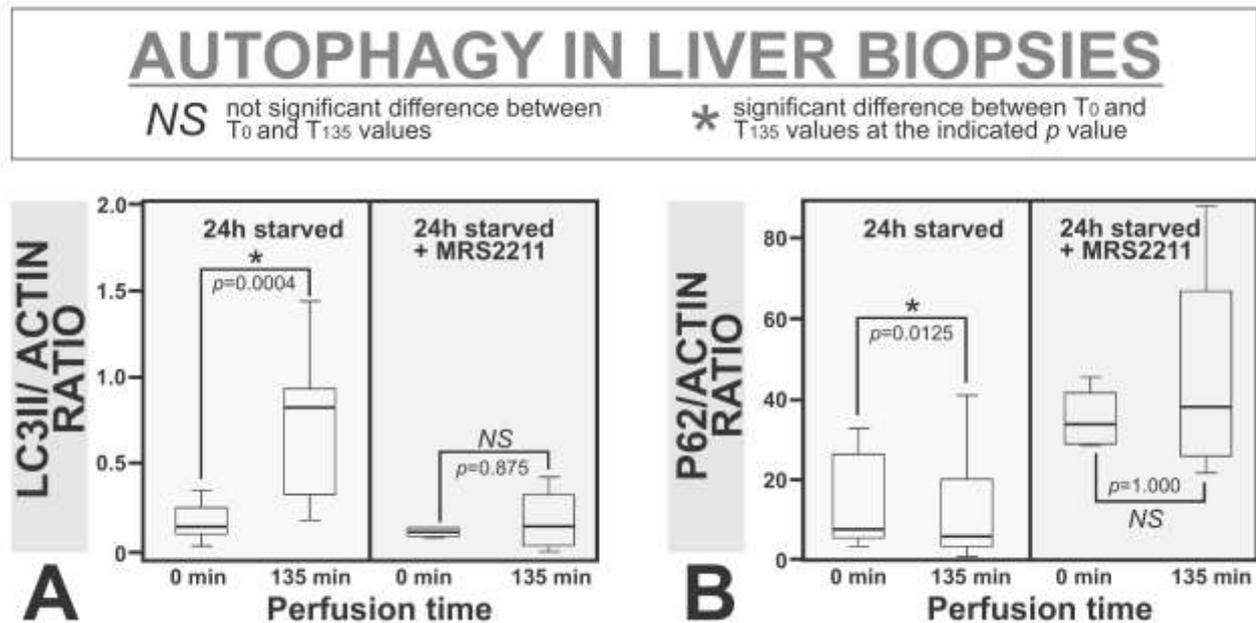


**Figure 6.4.4** - Libérations des métabolites (A) et des enzymes hépatiques (B) dans les perfusats observées dans les groupes à jeun 24h et 24h+MRS2211.

Les marqueurs d'autophagie, incluant les rapports LC3II/actine et p62/actine, ont été déterminés dans des biopsies de foies pour lesquels le contenu en perfusat a été mentionné et illustré (**Figure 6.4.4**) ci-dessus.

**Le rapport LC3II/actine** - L'induction de l'autophagie a été évaluée en documentant si une augmentation du rapport LC3II/actine s'était produite ou non dans les foies de rat à jeun 24 heures exposés ou non exposés au MRS2211. Comme indiqué dans un travail précédent [19], l'induction de l'autophagie a été constatée dans les foies de rat à jeun 24h qui n'ont pas été soumis à l'addition de composés dans la perfusion. L'augmentation du rapport LC3II/actine, marqueur d'autophagie à 135 min par rapport au temps 0 min était substantielle et significative (**Figure 6.4.5A, panneau de gauche**). En revanche, l'inclusion de 0,1 mM de l'antagoniste du récepteur P2Y13 : le MRS2211 a empêché l'augmentation du marqueur d'autophagie (**Figure 6.4.5A, panneau de droite**), indiquant son aptitude à inhiber l'induction de l'autophagie et donc la dépendance du récepteur P2Y13 à l'égard de l'induction d'autophagie observée en son absence (**Figure 6.4.5A, panneau de gauche**).

**Le rapport p62/actine** - Les représentations de Boxplot dans **la figure 6.4.5B** illustrent les changements du rapport p62/actine induits par la perfusion de 135 minutes. Alors qu'une diminution significative de ce marqueur (bien que moins spécifique que l'augmentation de la LC3II mais également indicative d'une augmentation de l'autophagie) a été observée dans les foies non exposés à l'inhibiteur du récepteur P2Y13, cette diminution n'a pas été observée dans les foies perfusés avec cet antagoniste du récepteur P2Y13, ce qui suggère également une perte de l'induction de l'autophagie sous l'antagoniste du récepteur P2Y13.

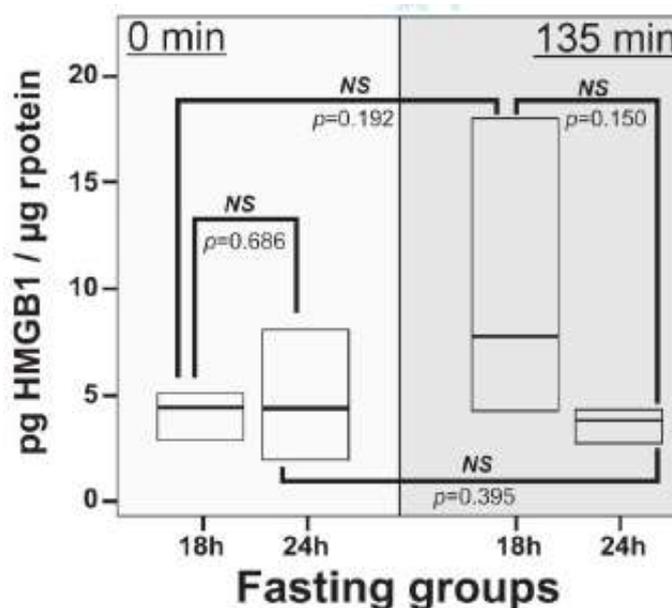


**Figure 6.4.5** - Modification des marqueurs de l'autophagie dans les biopsies hépatiques de groupes de foie de rat à jeun 24h et 24h+MRS2211. Rapport LC3II/actine (A) et p62/actine (B).

### Etude du rôle de l'HMGB1

Le rôle du récepteur P2Y<sub>13</sub> dans l'induction et la protection de l'autophagie dans le modèle de foie *ex vivo* est actuellement bien étayé par les résultats précédents. Cependant, comme la littérature a montré que le HMGB1 était incriminé *in vivo* dans l'effet hépatoprotecteur d'un jeûne de 24 heures chez les souris [17], sa contribution dans la protection des foies *ex vivo* de rats à jeun 24 heures a également été recherchée. À cette fin, l'HMGB1 a été mesurée dans des foies *ex vivo* isolés de rat à jeun 18 et 24 heures.

Aucune différence significative d'HMGB1 n'a été observée lorsqu'on compare les groupes de foies de rat à jeun 18h et 24h aux 2 temps. Les représentations Boxplot sont illustrées dans **la figure 6.4.6**. Utilisant la corrélation de Spearman pour comparer d'un côté le contenu en HMGB1 hépatique et de l'autre côté le marqueur de cytolyse hépatique LDH et le marqueur d'autophagie LC3II/actine, il n'y a pas de lien significatif entre ces 2 types de paramètres ( $p > 0,05$ ) dans les groupes de foies de rat à jeun 18h et 24h.



**Figure 6.4.6** : mesure de l'HMGB1 dans les biopsies de foie de rat à jeun 18h et 24h au début et en fin de perfusion

## Conclusion

Notre travail actuel met en évidence, dans un modèle expérimental, le rôle d'une augmentation du rapport ADP/AMP+ADP+ATP (et du rapport ADP/AMP+ATP) dans la protection des foies *ex vivo* de rat à jeun contre la cytolysse hépatique par l'activation de l'autophagie. Cette augmentation peut expliquer le comportement différent des foies de rat à jeun 18h versus 24h en terme de cytolysse, plus marquée pour les foies de rat à jeun 18h. De manière intéressante, la perfusion d'un antagoniste du récepteur P2Y13 : le MRS2211 pour inhiber le signal purinergique contre carre à la fois l'autophagie et la protection des foies de rat à jeun. L'ADP a un effet inverse, soulignant l'importance de la voie de signalment purinergique dans ce modèle. Le présent travail qui explore la signalisation des déclencheurs de l'autophagie, valide également le rôle protecteur de l'autophagie précédemment documenté dans le modèle de foies perfusés *ex vivo*. Le rôle de la chute de la charge énergétique en deçà d'un seuil permettant le déclenchement de la protection des foies *ex vivo* a été évaluée dans un précédent travail et a conduit à la proposition que sous un seuil de charge énergétique, les mécanismes de protection étaient empêchés [18].

Dans un travail ultérieur, l'autophagie a été identifié comme mécanisme producteur d'énergie. Cependant, les réserves énergétiques cellulaires (ainsi que la qualité des composants cellulaires nécessaires pour mobiliser ces réserves) ne doivent pas descendre en deçà d'un seuil pour permettre l'induction de l'autophagie [19]. Dans ce sens, Loos et al [42] avaient souligné le coût énergétique (besoin en ATP) ainsi que la nécessité d'avoir des niveaux suffisants d'ATP pour déclencher les étapes initiales de l'autophagie [43,44] mais également les étapes finales lysosomales : le gradient électrochimique des protons à travers la membrane lysosomale étant aussi consommateur d'ATP [45].

Une baisse de 30 à 50% de l'ATP pouvait entraîner une baisse de 70% de l'activité autophagique, indiquant la nécessité d'un seuil énergétique minimal pour le déclenchement de l'autophagie [42].

De manière remarquable et comme mentionné ci-dessus, cette conclusion s'applique également pour caractériser la protection des foies *ex vivo* provenant de rats nourris versus à jeun 18h [18] avant l'identification de l'autophagie comme processus de protection [19]. A cet égard, une bonne corrélation a été établie entre les capacités de mobilisation énergétique des foies *ex vivo* (glycogène + activité autophagique) et la protection du foie contre la cytolysse, indiquant que la protection des foies de rat isolés est favorisée par une capacité de mobilisation énergétique plus élevée [19].

Contrairement aux foies *in situ*, l'HMGB1 ne semblait pas, à priori, être un déclencheur majeur de la protection des foies *ex vivo* bien qu'une tendance non significative à l'augmentation de l'HMGB1 a été observée en fin de perfusion. En ce qui concerne les voies de signalisation capables de manager la déplétion énergétique avec la survie cellulaire, la voie de l'AMPK a également été considérée en priorité au vue de ses propriétés adaptatives énergétiques et de son rôle majeur dans la détection énergétique cellulaire [38].

Contrairement à la modulation du récepteur P2Y13, la stimulation de l'AMPK par l'AICAR n'a eu aucun impact sur la protection des foies *ex vivo*. Cependant, une augmentation de l'AMPK phosphorylé a été observée dans les foies de rat à jeun 24h versus à jeun 18h (Fig 6.4.1). De façon intéressante, comme l'AMP, l'ADP [46,47] peut contrôler l'état de phosphorylation de l'AMPK Thr172 détecté par l'anticorps utilisé dans la présente étude [48]. En fait, l'ADP peut diminuer le taux de déphosphorylation de l'AMPK Thr172 mais également favoriser sa phosphorylation [48]. De plus, dans certaines conditions, le lien AMPK-ADP est un lien qui prévaut par rapport au lien AMPK-AMP dans la voie de signalisation de l'activation de la phosphorylation de l'AMPK [49].

A cet égard, les changements de l'état de phosphorylation de l'AMPK observés dans ce travail entre les foies de rat à jeun 18h et 24h (Fig 6.4.1) pourraient être expliqués par les changements de contenu relatif de cofacteurs adényliques sous forme d'ADP (Fig 6.4.3) et ne sont pas en contradiction avec l'attribution de la protection au taux d'ADP cellulaire augmenté. Le tonus ADPergique est capable d'induire l'autophagie via le récepteur purinergique P2Y13 par l'inhibition de la voie de signalisation de l'Akt et par stimulation de la signalisation MAPK [36].

En conclusion, le rôle de protection établi dans ce travail par l'ADP et le récepteur purinergique pourrait avoir une pertinence immédiate dans l'hépatoprotection avec un intérêt particulier pour la préservation de greffon hépatique. L'addition, au médium de préservation de greffon hépatique, d'ADP ou de tout autre agoniste du récepteur P2Y13 toléré ou booster de la voie purinergique devrait faire l'objet d'une attention toute particulière. Cette stratégie devrait considérer que la stimulation de l'autophagie ne doit pas digérer, dégrader le greffon hépatique et augmenter le risque d'altération de son intégrité. En effet, compte tenu de son rôle double, l'autophagie devrait produire de l'énergie et

contrôler la qualité des composants cellulaires en digérant les composants cellulaires altérés pour produire de l'énergie tout en maintenant un greffon hépatique de haute qualité.

Comme déjà évoquée dans ces conclusions, la capacité de mobilisation énergétique doit être supérieure à un seuil donné pour permettre aux mécanismes de protection de se mettre en place, rendant opportun l'ajout combiné de substrats énergétiques et d'inducteur de l'autophagie (ADP ou autres agonistes du récepteur P2Y<sub>13</sub>) dans le milieu de préservation du greffon hépatique. Des travaux antérieurs ont suggéré l'oxaloacétate **[50]** et le lactate **[22]** comme substrats protecteurs de la charge énergétique et de l'intégrité cellulaire du foie.

## Bibliographie

- (1) Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des* 2014; 20:2950-2977.
- (2) Singh G, Krishan P. Dietary restriction regimens for fighting kidney disease: Insights from rodent studies. *Exp Gerontol* 2019; 128:110738.
- (3) Abiri B, Vafa M. Dietary Restriction, Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases: A Review of the Evidence. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1178:113-127.
- (4) Bok E, Jo M, Lee S, Lee BR, Kim J, Kim HJ. Dietary Restriction and Neuroinflammation: A Potential Mechanistic Link. *Int J Mol Sci* 2019; 20(3):464.
- (5) Sainsbury E, Kizirian NV, Partridge SR, Gill T, Colagiuri S, Gibson AA. Effect of dietary carbohydrate restriction on glycemic control in adults with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 139:239-252.
- (6) Hadem IKH, Majaw T, Kharbuli B, Sharma R. Beneficial effects of dietary restriction in aging brain. *J Chem Neuroanat* 2019; 95:123-133.
- (7) Brandhorst S, Harputlugil E, Mitchell JR, Longo VD. Protective effects of short-term dietary restriction in surgical stress and chemotherapy. *Ageing Res Rev* 2017; 39:68-77.
- (8) Kapahi P, Kaeberlein M, Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res Rev* 2017; 39:3-14.
- (9) Yuen AW, Sander JW. Rationale for using intermittent calorie restriction as a dietary treatment for drug resistant epilepsy. *Epilepsy Behav* 2014; 33:110-114.
- (10) Manni A, El-Bayoumy K, Thompson H. Docosahexaenoic Acid in Combination with Dietary Energy Restriction for Reducing the Risk of Obesity Related Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 19(1):28.
- (11) Jonsson WO, Margolies NS, Anthony TG. Dietary Sulfur Amino Acid Restriction and the Integrated Stress Response: Mechanistic Insights. *Nutrients* 2019; 11(6):1349.
- (12) Speakman JR, Mitchell SE, Mazidi M. Calories or protein? The effect of dietary restriction on lifespan in rodents is explained by calories alone. *Exp Gerontol* 2016; 86:28-38.
- (13) Lee C, Longo V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. *F1000Res*. 2016; 5:F1000 Faculty Rev-117.
- (14) Yu ZF, Mattson MP. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome: Evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res* 1999; 57:830-839.
- (15) Shinmura K, Tamaki K, Saito K, Nakano Y, Tobe T, Bolli R. Cardioprotective effects of short term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation* 2007; 116:2809-2817.
- (16) Shushimita S, van der Pol P, de Bruin RWF, Ijzermans JNM, van Kooten C, Dor FJ. Binding Lectin Is Involved in the Protection against Renal Ischemia/Reperfusion Injury by Dietary Restriction. *PLoS One* 2015; 10:e0137795.
- (17) Rickenbacher A, Jang JH, Limani P, Ungethüm U, Lehmann K, Oberkofler CE, et al. Fasting protects liver from ischemic injury through Sirt1-mediated downregulation of circulating HMGB1 in mice. *J Hepatol* 2014; 61:301-308.
- (18) Papegay B, Stadler M, Nuyens V, Kruys V, Boogaerts JG, Vamecq J. Short fasting does not protect perfused ex vivo rat liver against ischemia-reperfusion. On the importance of a minimal cell energy charge. *Nutrition* 2017; 35:21-27
- (19) Papegay B, Nuyens V, Albert A, Cherkaoui-Malki M, Leo O, Kruys V, et al. Protection in a model of liver injury is parallel to energy mobilization capacity under distinct nutritional status. *Nutrition* 2019;67-68.
- (20) Stadler M, Nuyens V, Boogaerts JG. Intralipid minimizes hepatocytes injury after anoxia-reoxygenation in an ex vivo rat liver model. *Nutrition* 2007; 23:53-61.
- (21) Papegay B, Stadler M, Nuyens V, Salmon I, Kruys V, Boogaerts JG. Alanine minimizes hepatocyte injury after ischemia-reperfusion in an ex vivo rat liver model. *Biocell* 2014; 38:25-32.
- (22) Papegay B, Nuyens V, Kruys V, Boogaerts JG, Vamecq J. L-Lactate-Based Improvement of Energetic Charge and Protection of Rat Liver. *Liver Transpl* 2019; 25:1571-1575
- (23) Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 2015; 22:367-376.
- (24) Klionsky DJ, Emr SD: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290:1717-1721.

- (25) Corona Velazquez AF, Jackson WT. So Many Roads: the Multifaceted Regulation of Autophagy Induction. *Mol Cell Biol* 2018; 38:e00303-18.
- (26) Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2016; 16:661-675.
- (27) Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012;441:523-540.
- (28) Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int* 2015;2015:417590.
- (29) Hsu C. Autophagy: A potential target for rescuing sepsis-induced hepatic failure. *Chin J Physiol* 2019;62(2):53-62.
- (30) Stipanuk MH. Macroautophagy and its role in nutrient homeostasis. *Nutr Rev* 2009;67:677-689.
- (31) He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009;43:67-93.
- (32) Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal* 2014;26:2694-2701.
- (33) Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012;32:2-11.
- (34) Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* 2010;190:881-892.
- (35) Zhu X, Messer JS, Wang Y, Lin F, Cham CM, Chang J, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J Clin Invest* 2015;125:1098-1110.
- (36) Chatterjee C, Sparks DL. Extracellular nucleotides inhibit insulin receptor signaling, stimulate autophagy and control lipoprotein secretion. *PLoS One* 2012;7:e36916.
- (37) Chatterjee C, Sparks DL. Hepatic lipase release is inhibited by a purinergic induction of autophagy. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:883-894.
- (38) S. Herzig, R.J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19:121-135.
- (39) Zerbe GO: Randomization analysis of the completely randomized design extended to growth and response curves. *J Am Stat Assoc* 1979; 74:215-221.
- (40) Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* 2016; 48:e224.
- (41) Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, von Kügelgen I, Li B, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 2020; 177:2413-2433.
- (42) Loos B, Engelbrecht AM, Lockshin RA, Klionsky DJ, Zakeri Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy* 2013; 9:1270-1285.
- (43) Blommaert EF, Luiken JJ, Meijer AJ. Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem J* 1997; 29:365-385.
- (44) Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Plomp PJ, Meijer AJ. Hepatic autophagy and intracellular ATP. A morphometric study. *Exp Cell Res* 1988; 177:103-108.
- (45) Van Dyke RW. Proton pump-generated electrochemical gradients in rat liver multivesicular bodies. Quantitation and effects of chloride. *J Biol Chem* 1988; 263:2603-2611.
- (46) Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ. AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP?. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:470-477.
- (47) Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Health R, Mayer FV, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011; 472(7342):230-233.
- (48) Willows R, Sanders MJ, Xiao B, Patel BR, Martin SR, Read J, et al. Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells. *Biochem J* 2017; 474(17):3059-3073.
- (49) Coccimiglio IF, Clarke DC. ADP is the dominant controller of AMP-activated protein kinase activity dynamics in skeletal muscle during exercise [published online ahead of print, 2020 Jul 30]. *PLoS Comput Biol* 2020; 16:e1008079.
- (50) Merlen G, Raymond VA, Cassim S, Lapierre P, Bilodeau M. Oxaloacetate Protects Rat Liver From Experimental Warm Ischemia/Reperfusion Injury by Improving Cellular Energy Metabolism. *Liver Transpl* 2019; 25:627-639.
- (51) Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.

(52) Wiechelman, K., et al. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175:231-7.

(53) Kessler, R. and Fanestil, D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 159:138-42.

(54) Brown, R., et al. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 180:136-9.

## CHAPITRE 7 : CONCLUSION GÉNÉRALE

La question que je me suis initialement posée en qualité de médecin anesthésiste, reposait sur l'effet du jeûne préopératoire sur le métabolisme et l'élimination/toxicité des agents anesthésiques. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle de foie de rat perfusé *ex vivo*.

De nombreuses études ont montré un effet protecteur du jeûne dans plusieurs domaines cités précédemment. Dans notre modèle, par contre, cette protection n'était pas retrouvée sur le foie isolé à partir d'un rat soumis à un jeûne de 18h. La cytolyse était plus importante que chez le rat nourri dès le début de l'expérimentation. La compréhension de ces résultats et l'identification des mécanismes hépatoprotecteurs/hépatotoxiques sous-jacents est alors devenu l'enjeu de mes travaux de doctorat.

Nos résultats ont d'emblée mis en avant la nature énergétique de l'hépatoprotection du foie isolé exposé à une ischémie/reperfusion. Plusieurs éléments ont contribué à cette première conclusion: le taux de glycogène, l'activité glycolytique, la charge énergétique et la mobilisation de substrats énergétiques. La protection observée pour les foies isolés de rats nourris vs à jeûn durant 18h a été corrélée à un taux de glycogène plus élevé et une réserve énergétique plus importante à savoir un rapport ATP/ AMP+ADP+ATP plus élevé. Ces premiers résultats ont orienté les travaux vers l'administration, *via* perfusion, de substrats énergétiques aux foies isolés d'animaux à jeun tels que le lactate et alanine (pré-doctoral). Ces substrats énergétiques influencent à la fois la néoglucogenèse hépatique et la production énergétique via le cycle de Krebs. Cette démarche d'ajout de substrats énergétiques à la perfusion permettait un apport d'énergie aux hépatocytes subissant un stress métabolique tel que la perfusion *ex vivo* et/ou de l'ischémie/reperfusion. La protection du foie isolé à jeûn observée dans ces conditions expérimentales ont permis de confirmer l'importance de la production et du maintien d'un niveau énergétique suffisant comme élément clef dans le développement de l'hépatoprotection du foie isolé.

Le lactate administré fournit à l'hépatocyte, un substrat énergétique pour assurer la néoglucogenèse (augmentation du NADH cytosolique) stimulée par le jeûne et secondairement la production d'énergie par couplage direct de la production de NADH cytosolique avec la chaîne d'électrons mitochondriale ou par la levée de l'inhibition de la *lactate oxydase* dépendante du NAD<sup>+</sup> située dans l'espace intermembranaire mitochondriale. L'alanine, acide aminé précurseur de glucose et antioxydant, peut d'une part participer à la néoglucogenèse et d'autre part stimuler la synthèse d'ATP par production d'acétyl coenzyme A directement utilisable dans le cycle de Krebs. Nous avons également observé une augmentation de l'apoptose dans le groupe traité avec l'alanine principalement au niveau des cellules de Kupffer. La mort cellulaire non inflammatoire de ces cellules pourraient faire partie de la protection observée lors de l'administration de ce substrat énergétique en éliminant ces cellules reponsables, dans certaines études, de lésions d'ischémie -reperfusion.

Dans nos expérimentations suivantes, nous avons étudié les mécanismes hépatoprotecteurs induits par l'extension du jeûne de 18 à 24h chez le rat avant d'isoler et perfuser le foie (ici sans ajout de substrats énergétiques dans la perfusion). Avec l'intention initiale d'aggraver la cytolyse observée dans les foies de rat à jeun 18h, nous avons prolongé à 24h, la durée de jeûne avant l'expérimentation. L'augmentation de cette durée de jeûne a, paradoxalement, diminué la cytolyse hépatique observée lors d'un jeûne de 18h sans toutefois restaurer le niveau de protection observé pour les foies isolés à partir de rats nourris. Nous avons à cette occasion identifié l'autophagie, comme mécanisme énergétique protecteur du foie isolé à jeûn. Nous avons apporté des évidences expérimentales que l'autophagie pouvait compenser la chute de la teneur en glycogène des foies de rat perfusé *ex vivo* soumis à un stress nutritionnel tel que le jeûne 24h. L'autophagie, tout comme les réserves en glycogène, participe à la capacité de mobilisation énergétique des cellules hépatiques et nous avons pu montrer que l'hépatoprotection du foie isolé était proportionnelle à cette capacité de mobilisation énergétique (réserve de glycogène + activité autophagique).

Nous nous sommes alors intéressés à l'identification des voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'autophagie et le niveau d'hépatoprotection lié au jeûne pré-expérimental. La figure 38 reprend les différentes voies d'activation explorées dans notre modèle de foie isolé comme inductrices de l'autophagie et de l'hépatoprotection.

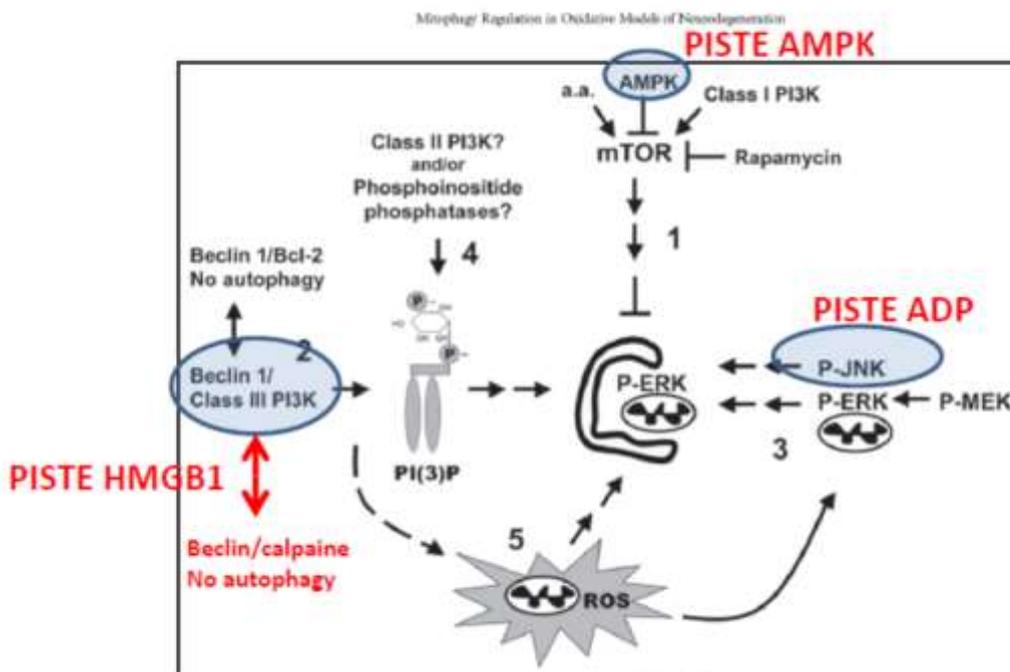


Figure 38– Voies d'activation de l'autophagie [1]

Initialement, un pivot de la signalisation de l'induction de l'autophagie, l'AMPK, a été évalué. L'AMPK activée lors du jeûne inhibe directement ou indirectement mTOR, active l'autophagie et permet la mobilisation énergétique nécessaire à la survie cellulaire. Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK dans les foies de rat à jeun 24h par rapport aux foies de rat à jeun 18h en début d'expérimentation. Néanmoins, l'adjonction d'un activateur de l'AMPK, l'AICAR, dans le groupe de rat à jeun 18h a augmenté la phosphorylation de l'AMPK sans cependant apporter de bénéfice en termes d'hépatoprotection du foie isolé. Cette voie ne nous a donc pas semblé à l'origine de la protection relative apportée par un jeûne prolongé.

Une deuxième voie de signalisation a été évaluée : l'HMGB1 l'accumulation cytoplasmique de l'HMGB1 étant connue pour induire l'autophagie. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le taux d'HMGB1 hépatique, la cytolysse hépatique (LDH) et le marqueur de l'autophagie : LC3II/Actine.

Une troisième voie de signalisation a finalement été explorée, celle des nucléotides purinergiques. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes pour l'AMP (initialement ciblée avec l'AMPK comme facteur plausible d'induction de l'autophagie), par contre, l'ADP sous la forme d'un rapport  $ADP/(AMP+ADP+ATP)$  et  $ADP/(AMP+ATP)$  s'est révélé significativement plus élevé dans le groupe des foies de rat à jeun 24h au début de l'expérimentation. L'ADP a ensuite été considéré comme un inducteur de l'autophagie par activation du récepteur P2Y13. Cette hypothèse nous a conduits à administrer un inhibiteur de ce récepteur : le MRS2211 dans le perfusat chez les rats à jeun 24h. L'inclusion de MRS2211 dans le perfusat a significativement augmenté la cytolysse du groupe à jeun 24h et empêché l'augmentation du rapport LC3II/actine marquant sa capacité à inhiber l'autophagie. Parallèlement, aucune baisse du rapport p62/Actine n'a été observée confirmant la perte d'induction de l'autophagie. L'ADP est capable d'induire l'autophagie par fixation au récepteur purinergique P2Y13, inhibition de la signalisation Akt et stimulation de la voie MAPK.

## CHAPITRE 8 : PERSPECTIVES

### 8.1. Perspectives mécanistiques

#### 8.1.1. Utilisation d'autres techniques pour la détection de l'autophagie

Il serait intéressant d'étudier l'activation de l'autophagie par la présence d'autophagosomes en microscopie électronique et utiliser des techniques d'immunofluorescence pour comprendre la localisation et les mouvements des protéines impliquées entre le noyau et le cytoplasme.

#### 8.1.2. Caractérisation du mécanisme de signalisation de l'autophagie induite par l'activation de P2Y13 par une approche pharmacologique complémentaire.

Nos expérimentations ont mis en évidence l'importance du récepteur P2Y13 dans l'hépatoprotection du foie isolé de rat. Nos résultats ouvrent la voie pour mieux comprendre, exploiter et caractériser le mécanisme de signalisation de l'autophagie induite par l'activation de ce récepteur par les molécules disponibles pour cette approche pharmacologique. L'activation du récepteur P2Y13 par l'ADP peut agir de plusieurs manières au sein des cellules hépatiques : activation de la phosphorylation de ERK 1/2, inhibition de la phosphorylation du récepteur de l'insuline par elle-même (IR- $\beta$ ), inhibition de la phosphorylation de la protéine kinase Akt.

L'utilisation d'inhibiteur sélectif de Akt ou de ERK 1/2 pourrait moduler l'activation de l'autophagie stimulée par l'activation du récepteur purinergique.

En amont, le rôle de l'insuline, par stimulation de la phosphorylation de la protéine Akt pourrait également moduler l'effet de l'ADP sur le récepteur P2Y13.

#### 8.1.3.-Identification du mécanisme d'utilisation du lactate comme substrat énergétique par le foie

L'hypothèse émise pour la protection, par le lactate, du foie *ex vivo* pourrait être challengée par l'utilisation d'inhibiteur du complexe d'oxydation mitochondriale et/ou d'un inhibiteur de la lactate oxydase afin de confirmer le détournement de l'utilisation du lactate exogène vers une voie de production énergétique plutôt que vers la néoglucogenèse.

#### 8.1.4. Rôle de Sirt1 dans l'induction de l'autophagie en condition de jeûne

A la fois, l'autophagie et les sirtuines protègent les cellules contre le stress cellulaire. Le jeûne ou la restriction calorique sont des conditions connues pour stimuler l'autophagie. De manière similaire, l'activité de la Sirtuine1, une déacétylase NAD<sup>+</sup> dépendante, est également impliquée dans la survie cellulaire, le métabolisme et l'adaptation au stress cellulaire. Lors du jeûne, la Sirt1 peut induire l'autophagie soit directement par déacétylation de gènes autophagiques tels que Atg5, Atg 7 et LC3 mais peut également moduler l'expression de molécules régulatrices de l'autophagie. Sirt1 peut indirectement induire l'autophagie par l'activation de la voie AMPK et l'inhibition de mTOR mais également entraîner la phosphorylation de ERK 1/2 [2-5].

Le rôle joué par l'activation de Sirt1 dans le mécanisme de protection qu'est l'autophagie sur les lésions de cytolysse dans le modèle de foie *ex vivo* pourrait faire l'objet de travaux ultérieurs.

#### 8.1.5. Etude de la fonction du foie

Nos travaux ont porté essentiellement sur l'état et non sur la fonction du foie. Il serait ainsi intéressant de corrélérer nos résultats avec des mesures de la fonction hépatique. Un test quantitatif de clairance évalue la fonction d'élimination en mesurant soit la vitesse de disparition de la substance éliminée par le foie dans le médium, soit l'apparition d'un métabolite toxique. La substance peut soit être un colorant : le vert d'indocyanine ou un médicament : la lidocaïne. De plus, le métabolisme des agents d'anesthésie tels que la lidocaïne pourrait être étudiée à différents niveaux de jeûne.

## **8.2 Autres modèles animaux**

### **8.2.1. Les avantages du modèle *ex-vivo***

Le modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo* permet de répéter les prélèvements dans le perfusat durant toute l'expérimentation, il permet également de soumettre le foie à des produits pharmacologiques à différentes concentrations et d'en évaluer leurs effets, ceci sans exposer les animaux vivants aux effets toxiques et parfois douloureux de ces molécules.

La technique, une fois bien standardisée et maîtrisée par l'expérimentateur, permet une utilisation moindre d'animaux de laboratoire. Elle permet également de comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques du foie indépendamment des autres organes et hormones du corps.

De plus, contrairement aux cultures d'hépatocytes, l'architecture hépatique est conservée ainsi que les relations intercellulaires au sein de l'organe étudié.

### **8.2.2. Les limites du modèle *ex-vivo***

Le modèle de foie de rat perfusé *ex-vivo* possède des limitations telles que le mode de perfusion par la veine porte et non pas par la veine porte et l'artère hépatique, l'absence d'éléments figurés ou de protéines dans la solution de perfusion. Ceux-ci pourraient être impliqués dans certains mécanismes énergétiques comme transporteurs (les globules rouges).

L'absence d'interaction du foie avec les autres organes ne permet pas d'évaluer l'influence hormonale et autres interactions que pourraient apporter la connexion à l'ensemble de l'organisme. Un modèle de foie *in vivo* permettrait une approche plus physiologique.

L'utilisation d'un volume de perfusion important peut limiter la possibilité de détection des appareils de mesure.

### **8.2.3. Autres modèles murins**

Le modèle de foie de rat ne permet pas encore une approche de biologie moléculaire. Bien qu'un modèle de rat KO pour le gène codant le récepteur P2Y14 ait été décrit, il n'existe pas encore à notre connaissance de rat génétiquement modifié pour le récepteur P2Y13 [6]. En alternative, l'utilisation de modèle de souris permettrait le développement d'une approche plus génétique des mécanismes de protections. L'utilisation de souris KO pour les gènes impliqués dans l'autophagie nécessitent une analyse approfondie car certaines délétions sont létales durant l'embryogenèse ou durant le premier jour de vie de l'animal. Cela permettrait cependant de confirmer notre hypothèse d'activation de l'autophagie comme mécanisme protecteur.

Un autre moyen de définir le rôle de l'autophagie dans la protection observée serait l'utilisation de souris Knock out de gène conditionnel. Cette technique permettrait l'élimination du gène spécifique étudié dans le tissu tel que le foie mais également au sein des hépatocytes, des cellules de Kupffer ou de tout autre type cellulaire présent au sein du foie. Des souris KO pour certains gènes atg 5,7 ainsi que des souris KO pour le récepteur P2Y13 existent et peuvent être utiles à l'étude génétique du phénomène autophagique dans le foie [7].

Pour confirmer l'importance de la charge énergétique des cellules sur la protection, il serait intéressant d'utiliser des souris KO pour certains gènes codant pour les enzymes de la synthèse et dégradation de glycogène ou pour l'utilisation de substrats énergétiques compensant le déficit lié au jeûne.

### **8.2.4. Modèles de cultures cellulaires**

Des modèles cellulaires tels que la culture d'hépatocytes peuvent permettre d'élucider le rôle de chacun des types cellulaires dans les phénomènes de protection mis en évidence. Cependant, la culture d'un type cellulaire ne permet plus alors de comprendre les interactions possibles entre les différentes cellules au sein d'un même tissu comme le foie.

Des cultures cellulaires transféctées par un siRNA pour inhiber des séquences du récepteur P2Y13 pourraient également être utilisée pour évaluer l'activation de l'autophagie par ce récepteur [8,9].

## **8.3 Perspectives cliniques**

### **8.3.1. Les transplantations d'organe**

Dans le cadre de la greffe hépatique, la qualité du greffon est un élément très important pour la survie et le fonctionnement adéquat de l'organe transplanté. Or, peu d'études se sont intéressées à l'état énergétique du foie avant transplantation. Les effets du jeûne avant prélèvement de l'organe ont peu été étudiés. Il serait intéressant de mesurer le taux de glycogène et le niveau d'autophagie des hépatocytes en fonction de la durée du jeûne lors du prélèvement ainsi que d'évaluer l'effet de l'apport de substrat énergétique dans les différents solutés de préservation de l'organe sur la survie et le fonctionnement de celui-ci. Les éléments étudiés dans le cadre de la préservation d'organe restent à ce jour, le types de solutés, le types de perfusion et le degré d'hypothermie mais peu de choses existent sur les solutés énergétiques [10].

De même, l'effet d'un apport énergétique avant prélèvement de l'organe, par exemple nutrition parentérale chez le donneur, devrait également être évalué sur le devenir du greffon chez le receveur, notamment sur la fonction hépatique.

### **8.3.2. Les patients chirurgicaux**

Les règles de jeûne préopératoire font que nos patients ni ne boivent ni ne mangent durant 6h avant la chirurgie élective. Or, Le jeûne pré-opératoire et la chirurgie associée entraînent des stress cellulaires responsables d'une insulino-résistance et une immunodéficience post-opératoire ainsi qu'une suractivation des mécanismes proinflammatoires. De plus, en tant qu'anesthésistes, nous leur administrons des médicaments potentiellement hépatotoxiques. Il serait intéressant dans un avenir proche de s'intéresser à l'effet de l'administration périopératoire de perfusion contenant des substrats énergétiques ou d'évaluer par des marqueurs biologiques tels que IL6 ou TNF $\alpha$ , l'effet de la durée du jeûne préopératoire sur l'activation des mécanismes proinflammatoires.

### **8.3.3. Les maladies génétiques**

La fonction énergétique de l'autophagie nécessite que les produits provenant de l'hydrolyse des macromolécules par les autolysosomes puissent être utilisés comme substrats énergétiques. Dans le cadre des maladies héréditaires du métabolisme affectant l'oxydation des acides aminés ou celle des acides gras, cette capacité énergétique de l'autophagie se voit amputée, un aspect pouvant contribuer à une hépatoprotection moindre et par là à la décompensation hépatique pouvant être observée lors du jeûne chez les patients souffrant de ces pathologies.

#### **8.4. Bibliographie**

- (1) Chu and Al, Beclin 1-independent Pathway of Damage-Induced mitophagy and Autophagy stress: Implications for Neurodegeneration and Cell Death. *Autophagy*, 2007.
- (2) Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Scwartz J, Liu W. Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Mol Cell*. 2015 ;57(3) :456-66.
- (3) Lee IH, Yun J, Finkel T. The Emerging Links Between Sirtuins and Autophagy. *Methods Mol Biol*.2013; 1077:259-271.
- (4) Lee H. Mechanisms and disease implications of sirtuin-mediated autophagic regulation. *Exp Mol Med*. 2019 ;51(9) :102.
- (5) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802937400003X>
- (6) Li H, Jiang W, Ye S, Zhou M, Liu C, Yang X, Hao K, Hu Q. P2Y14 receptor has a critical role in acute gouty arthritis by regulating pyroptosis of macrophages. *Cell Death Dis*. 2020 May 26;11(5).
- (7) Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy* 2017; 10, 1619-1628.
- (8) Chatterjee C, Sparks DL. Extracellular Nucleotides Inhibit Insulin Receptor Signaling, Stimulate Autophagy and Control Lipoprotein Secretion. *PLoS ONE* 2012; 7(5) : e36916.
- (9) Chatterjee C, Sparks DL. Hepatic Lipase Release is Inhibited by a Purinergic Induction of Autophagy. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33:883-894.
- (10) Buchwald JE, Xu J, Bozorgzadeh A, Martins PN. Therapeutics administered during ex vivo liver machine perfusion: An overview. *World J Transplant*. 2020; 10(1):1-14.

## CHAPITRE 9 : LISTE D'ARTICLES PUBLIÉS

- Alanine minimizes hepatocyte injury after ischemia-reperfusion in an *ex vivo* rat liver model. B. Papegay, M. Stadler, V. Nuyens, I. Salmon, V. Kruys, J. Boogaerts. *BIOCELL* (2014) 38(1-3), 25-32.
- Short fasting does not protect perfused *ex vivo* rat liver against ischemia-reperfusion. On the importance of minimal cell energy charge. B. Papegay, M. Stadler, V. Nuyens, V. Kruys, J. Boogaerts and J. Vamecq. *Nutrition* (2017) 35, 21-27.
- Protection in a model of liver injury parallels to energy mobilization capacity under distinct nutritional status. B. Papegay, V. Nuyens, A. Albert, M. Cherkaoui-Malki, O. Leo, V. Kruys, J.G. Boogaerts and J. Vamecq. *Nutrition* (2019) 67-68: 110517.
- L-lactate-based improvement of energetic charge and protection in rat liver injury. B. Papegay, V. Nuyens, V. Kruys, J.G. Boogaerts, and J. Vamecq. *Liver Transplantation* (2019) 25(10), 1571-1575.
- Mitochondrial dysfunction, AMPK activation and peroxisomal metabolism: a coherent scenario for non-canonical for 3-methylglutaconic acidurias. J. Vamecq, B. Papegay, V. Nuyens, J. Boogaerts, O. Leo, and V. Kruys. *Biochimie* (2020) 168, 53-82.

L'effet protecteur du jeûne a été observé dans plusieurs domaines de la santé. Pour l'étudier, un modèle de foie de rat perfusé *ex vivo* a ici été utilisé. Dans ce modèle, nous n'avons pas observé, pour un jeûne de 18h, l'effet protecteur du jeûne rapporté pour le foie *in situ*. Nous avons cependant souligné l'importance du coût énergétique du mécanisme protecteur du foie isolé soumis au stress expérimental de l'ischémie/reperfusion et corrélé la protection à un taux plus élevé de glycogène et une charge énergétique nécessitant le dépassement d'un seuil en deçà duquel la protection s'estompait. L'administration de substrats énergétiques (lactate et alanine) nous a permis de confirmer le besoin énergétique de la protection du foie isolé. Ensuite, l'accroissement de la durée du jeûne du rat donneur de 18 à 24 heures s'est avérée hépatoprotectrice et, plus globalement, a montré que la capacité de mobilisation énergétique et, à ce titre, l'autophagie contribuaient à l'hépatoprotection, le coût énergétique bien connu de l'autophagie étant en adéquation avec les précédents travaux du doctorat. Trois voies de signalisation candidates pour l'activation de l'autophagie, impliquant AMPK, HMGB1 et ADP, ont été étudiées. La phosphorylation de l'AMPK était augmentée dans le foie de rat à jeun 24h vs 18h. Toutefois, l'ajout d'AICAR, un activateur de l'AMPK, bien qu'augmentant sa phosphorylation dans le foie isolé de rat à jeun 18h, n'a pas induit de protection. L'accumulation cytoplasmique d'HMGB1, connue pour induire l'autophagie, n'a montré aucune corrélation avec les marqueurs de la cytolyse hépatique (LDH) et de l'autophagie (rapport LC3II/Actine). L'ADP, dans ses rapports  $ADP/(AMP+ADP+ATP)$  et  $ADP/(AMP+ATP)$ , était plus élevée pour les foies de rat à jeun 24h et a été corrélée à l'hépatoprotection. L'ADP induisant l'autophagie par activation du récepteur membranaire P2Y13, un inhibiteur spécifique, le MRS2211, a été utilisé. Son inclusion dans le perfusât a estompé l'hépatoprotection et l'activation de l'autophagie associées au prolongement de la période de jeûne, validant le rôle-clé de cette signalisation dans l'hépatoprotection.

En conclusion, le doctorat a permis une avancée substantielle de la compréhension du rôle joué par le statut nutritionnel du sujet donneur sur l'hépatoprotection du foie isolé. L'identification des mécanismes moléculaires de l'hépatoprotection (mobilisation énergétique, autophagie) et de sa signalisation (ADP, récepteur P2Y13) ouvrent des perspectives thérapeutiques innovantes des maladies du foie et de nouvelles stratégies de préservation du greffon hépatique. Dans une optique de survie cellulaire, l'autophagie assure à la fois une fonction de maintien de la qualité des composants cellulaires et un rôle énergétique. Ce maintien de qualité protège la cellule, elle coûte en énergie rendant cette dernière indispensable à ce type de protection. Autrement dit, la maintenance préserve de la détérioration et cette protection a un coût qui passe par une signalisation (décision interne de financement) qui, identifiée, peut désormais être sollicitée comme souhaité. Aussi, un financement externe (apport de substrats énergétiques) peut être choisi voire ajouté au précédent.