

## II- LES MODELES DE TOXICITE

Actuellement, l'utilisation des animaux est essentielle pour la recherche scientifique. Toutefois le modèle animal ne prédit pas vraiment bien les réactions d'un composant chimique sur l'organisme humain et l'étude est onéreuse et lente. Enfin de compte, le but est de savoir si un composant chimique endommage ou non les cellules. De ce fait, au lieu d'analyser tout l'animal, il faut regarder les cellules prélevées de différents organes. Il est possible ainsi de tester des milliers voire des centaines de milliers de composants chimiques quotidiennement afin de déterminer leur possible toxicité. Les chercheurs peuvent faire de dix à cent études par an sur des rats ou des souris mais plus de 10.000 sur des cellules et des molécules en un seul jour avec ces outils informatiques et d'analyse cellulaire. Cependant, il n'est pas facile d'abandonner du jour au lendemain les tests sur les animaux.

### 2.1- L'HEPATOTOXICITE

#### 2.1.1- Exemples de certains agents hépatotoxiques

##### A- L'acétaminophen (paracétamol)

Le paracétamol est une molécule ancienne, bien caractérisée en thérapeutique tant pour ses effets bénéfiques qu'indésirables. C'est le prototype des antalgiques dits "périphériques" et le chef de file d'une vaste famille de produits aux structures et aux modes d'actions divers: les antalgiques non opiacés. Il exerce une activité antipyrétique bien connue à la différence des composés salicylés, il ne possède pas d'effet anti-inflammatoire ni anti-hémostatique et n'est pas toxique pour la muqueuse gastro-duodénale (Monassier, 2005).

##### Métabolisme et toxicité

L'acetaminophen est majoritairement absorbé au niveau de l'intestin grêle dans les 60 minutes suivants l'ingestion. Il est transformé dans le foie en p-aminophénol qui diffuse, comme le paracétamol, à travers la barrière hématoencéphalique puis est métabolisé en AM 404 (combinaison entre le paracétamol et l'acide arachidonique) (Hogestat et *al.*, 2005).

Une faible proportion du paracétamol est métabolisée par un système oxydatif dépendant du cytochrome P450, qui le transforme en un composé hautement réactif le N-acétyl- p- benzoquinone -imine. Ce composé est en situation normale inactivé par le glutathion qui s'y fixe au moyen de ses radicaux sulfhydryles puis éliminé. Aux doses thérapeutiques, 90 à 100% du paracétamol sont retrouvés dans les urines sous forme conjuguée avec l'acide glucuronique (60%), sulfurique (35%), ou la cystéine (3%). La demie vie sera prolongée chez l'enfant qui possède des capacités de glucuroconjugaison inférieures à celles de l'adulte (Monnassier, 2005).

L'intoxication par le paracétamol pourrait survenir après l'absorption de plus de 10 grammes par jour chez l'adulte ou de plus de 100 à 150 mg/kg chez l'enfant (plus de 2 à 3 fois la dose

maximale quotidienne tolérée). Elle se manifeste essentiellement par une importante cytolyse hépatique : nausées, vomissements, douleurs abdominales, augmentation des transaminases, de la bilirubinémie, de la LDH et diminution des taux de prothrombine (dans les 12 à 48 heures après l'ingestion). Cette nécrose hépatique est consécutive à la dénaturation des protéines cellulaires par la N-acétyl-p-bezoquinone-imine. Ce composé est produit en trop grande quantité du fait de la saturation des processus de conjugaison et de l'impossibilité du foie à le métaboliser et consécutivement à l'effondrement de ses stocks de glutathion. Le traitement de l'intoxication au paracétamol comporte deux volets: l'évacuation rapide et aussi complète que possible du contenu gastrique et l'administration la plus précoce possible de l'antidote (N-acétylcystéine ou flumucil) donneur de groupement SH qui, au contraire du glutathion traverse les membranes cellulaires. Ce traitement est très efficace dans les 8 premières heures après l'intoxication. Son efficacité diminue à partir de la dixième heures pour devenir quasiment inefficace après la 15<sup>ème</sup> heures (Monnassir, 2005).

### **Toxicité hépatique**

Le profil classique du paracétamol est celui d'un produit bien toléré mais susceptible d'induire une insuffisance hépatique aigue dose-dépendante. Aux doses thérapeutiques usuelles, la tolérance hépatique du paracétamol est bonne (Dart, 2007). Son métabolite, le NAPQI toxique provoquant une nécrose des hépatocytes et est neutralisé par le glutathion. En revanche, l'hépatotoxicité du paracétamol apparaît lorsqu'il y a un surdosage, provoquant une saturation du processus de détoxification hépatique, notamment une déplétion des réserves en glutathion. La toxicité hépatique du paracétamol se manifeste donc en cas d'intoxication aigue qu'elle soit accidentelle ou volontaire. Malgré l'existence de cet antidote bien connu, un article récent évoque un nombre annuel de 500 décès aux USA dus à l'hépatotoxicité du paracétamol et des recommandations pour la prise en charge des intoxications par le paracétamol viennent d'être publiées en Australie ce qui montre que ce problème de l'hépatotoxicité du paracétamol reste bien actuel (Daly et *al.*, 2008).

Chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique chronique, le paracétamol pris à doses thérapeutiques présente un temps de demi vie augmenté mais ne semblerait pas entraîner d'avantage de dommages hépatiques. Il a souvent été dit que l'hépatotoxicité du paracétamol est potentialisée chez des patients souffrant d'alcoolisme chronique. Ces données ont été discutées par certains auteurs. Chez l'animal, une administration chronique d'éthanol induit une hépatotoxicité du paracétamol. Cependant, contrairement aux animaux, il n'y a pas d'augmentation du taux des métabolites toxiques du paracétamol. Chez l'alcoolique chronique, il apparaît clairement que la toxicité du paracétamol est complexe et que d'autres études doivent être menées.

## 2.1.2- Modèles de cirrhose toxique

### A- Modèle au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>)

Ce modèle est l'un des plus anciens décrit en 1936 par Cameron et Karunaratne. La toxicité du CCl<sub>4</sub> est due à sa transformation en radical trichlorométhyl libre (CCl<sub>3</sub>) par activation de cytochromes P450, notamment CYP2E1 (Rechnagel et Glende, 1973). La toxicité du CCl<sub>4</sub> peut être renforcée par l'association d'inducteurs enzymatiques tels que le phénobarbital (Tamayo, 1983), l'alcool (Bosma et *al.*, 1988) ou l'acétone (Charbonneau et *al.*, 1986), ou par un régime pauvre en vitamine A. L'administration aiguë de CCl<sub>4</sub> est responsable d'une toxicité, essentiellement centrolobulaire, suivie d'une prolifération hépatocytaire en 24 heures et d'une régénération totale en 4 jours. L'administration chronique est responsable d'une diminution du glutathion intracellulaire et d'une augmentation du collagène intrahépatique. L'effet toxique du CCl<sub>4</sub> dépend de la dose et de la voie d'administration, mais la toxicité n'est pas cumulative nécessitant une administration régulière et un délai relativement court entre 2 administrations (5 à 7 jours). L'administration intrapéritonéale (0,5 à 1 mg/kg, 2 injections de 0,1 à 0,5 ml/semaine) et le gavage (solution à 50 %, 0,3 ml/100 g, 2 fois/semaine) sont les 2 voies les plus fréquemment employées en raison du délai d'apparition de la cirrhose (12 à 15 semaines) et d'une moindre toxicité extrahépatique. L'administration conjointe de phénobarbital permet de réduire le délai d'apparition de la cirrhose à 8 à 10 semaines (Ballet et Poupon, 1989).

Globalement, on observe l'apparition d'une cirrhose chez 70 à 80 % des animaux traités. L'obtention d'une cirrhose a été optimisée en adaptant la dose de CCl<sub>4</sub> à la courbe de poids de l'animal au cours du temps. La mortalité est essentiellement observée au cours de la première semaine (20 à 60 % selon les espèces, 20 % chez le rat). L'administration chronique de CCl<sub>4</sub> est responsable de la survenue d'une cirrhose nodulaire comparable à celle observée chez l'homme (Dashti et *al.*, 1989). Après arrêt de l'exposition, les altérations cellulaires disparaissent en 4 semaines et la fibrose serait réversible en 2 à 4 mois (Martinez – Hernandez et *al.*, 1991).

### B- Modèle au diméthylnitrosamine (DMNA)

Ce modèle est caractérisé par sa rapidité, sa simplicité, son coût faible et sa très bonne reproductibilité d'un animal à l'autre. Le DMNA est métabolisé par l'intermédiaire de cytochromes P450 2E1 en acétaldéhyde. La toxicité aiguë du DMNA est responsable d'une coagulation intra-sinusoïdale, d'où une congestion vasculaire et une nécrose hépatocytaire centrolobulaire (Nagase et *al.*, 1995).

Chez le rat, le modèle initial permettait l'obtention d'une cirrhose en 9 semaines par administration intragastrique de DMNA 4 jours par semaine pendant 8 semaines avec une semaine d'arrêt après 1 mois de traitement. Le DMNA peut également être administré par voie

intrapéritonéale (3 mg/100 g poids corporel, 3 jours de suite par semaine, pendant 3 à 5 semaines) Au terme des 3 semaines de traitement, on observe une perte de poids corporel (- 20 %), un foie atrophique et ferme à surface granuleuse et hyperhémisée, avec des veines sushépatiques tortueuses et des sinusoides dilatés, une fibrose centro-lobulaire avec des espaces portes normaux et des septa centro-portes. Il existe une HTP sinusoidale avec présence d'ascite dans 50 % des cas (Shibayama et Nakata, 1991).

La rapidité de survenue de la cirrhose pourrait être expliquée par une intense réponse immunitaire liée à la modification d'antigènes membranaires lymphocytaires. A l'arrêt du traitement, les lésions ne régressent pas et ont tendance à s'aggraver avec le temps. La mortalité atteint 45 %, 15 jours après l'arrêt de l'administration (Jenkins et *al.*, 1985).

### **C- Modèle au thioacétamide (TAA)**

L'administration chronique de TAA chez le rat est réalisée dans l'eau de boisson à la concentration de 300 mg/L. Ce modèle permet de créer une cirrhose micronodulaire dans 100 % des cas en 3 à 6 mois, avec une mortalité faible comprise entre 0 et 20 % (Zimmermann et *al.*, 1992). Les animaux atteints de cirrhose ont une discrète perte de poids avec hépatomégalie et splénomégalie. Les modifications histologiques sont surtout patentes après les 2 premiers mois de traitement. Il existe alors une fibrose périportale et des septa porto-portes, Centro-portes, associés à une prolifération cholangiolaire pouvant aboutir à une tumeur biliaire. A l'arrêt du traitement, les lésions persistent pendant 2 mois (Muller et *al.*, 1988).

### **D- Modèle de cirrhose biliaire secondaire**

Ce modèle a été décrit en 1932 par Cameron et Oakley chez le rat. Depuis il a été réalisé dans plusieurs espèces animales (rat, chien, lapin, singe, chat). Son principe est une interruption du flux biliaire soit par ligature-section, soit par occlusion du canal cholédoque ou (Gerling et *al.*, 1996).

Le modèle classique de ligature-section chez le rat permet d'obtenir, en 3 à 4 semaines, une cirrhose biliaire chez environ 80 % des animaux opérés. Les échecs étant liés principalement à l'apparition de voies collatérales biliaires situées autour du canal cholédoque (Kontouras et *al.*, 1984). La méthode d'occlusion chimique (EthyblocT) permet un taux de cirrhose proche de 100 %. Le taux de mortalité varie de 25 à 40 % à 4 semaines. Les pertes surviennent principalement durant la première semaine (cholangite, péritonite biliaire, hémorragie) et les animaux survivent rarement plus de 8 à 10 semaines.

Macroscopiquement, il existe une hépatomégalie dure et bosselée avec splénomégalie, ainsi qu'une diminution du poids corporel. Le bilan biologique sanguin montre une cholestase ictérique dès l'obstruction biliaire, atteignant un plateau en 15 jours (10 à 20 fois la normale) (Kontouras et *al.*, 1984).

Ce modèle se caractérise par l'apparition d'une fibrose pure, sans ou avec minime inflammation. Il s'agit d'une fibrose péri-portale et portale extensive, mutilante, associée à une intense prolifération ductulaire biliaire, sans véritable nodule de régénération. La prolifération des cellules biliaires pourrait être initiée par l'augmentation de la pression dans les voies biliaires secondaire à l'obstruction biliaire (Zimmermann et *al.*, 1993). Au cours du temps, le nombre d'hépatocytes diminue et l'on observe une perte de l'architecture normale avec anomalies de la microcirculation hépatique (shunts intra-hépatiques, diminution de l'espace vasculaire total et des sinusoides) (Ohara et *al.*, 1993). Une étude a suggéré que le degré de fibrose était corrélé à l'augmentation du nombre de cellules stellaires et de cellules de Kupffer (Grinko et *al.*, 1995).

Après anastomose bilio-digestive chez des rats ayant une cirrhose biliaire secondaire, il semble que les lésions hépatiques puissent être réversibles (Zimmermann et *al.*, 1992).

### **2.1.3- Hypertension portale extra-hépatique (HTP)**

Ces modèles se caractérisent par l'existence d'une HTP sans fibrose hépatique et avec de nombreux shunts porto-systémiques. Ils permettent ainsi une étude sélective des phénomènes purement hémodynamiques de l'HTP.

#### **A- Ligature calibrée de la veine porte**

Ce modèle a été décrit en 1913 par Neuhof chez le chien, puis par Reynell chez le rat. Il a ensuite été réalisé dans de nombreuses espèces (lapins, singes, cochons). Il consiste en une sténose calibrée de la veine porte juste en amont de sa division. La sténose peut être réalisée par une ligature au fil de soie (rat, lapin) selon la technique décrite en 1960 par Halvorsen et Myking ou par un constricteur améroïde (chien). Les modèles réalisés chez le lapin, chien ou porc semblent plus intéressants pour les modèles de varices œsophagiennes. Il s'agit d'un modèle d'HTP pure avec des résistances vasculaires intra-hépatiques normales. Une discrète diminution du volume hépatique témoignant de l'effet hépatotrophique du sang portal, et un infiltrat lymphocytaire modéré porte ont été rapportés. Le taux de mortalité est inférieur à 10 %. La survie est directement fonction de l'âge (6 à 7 semaines) et du poids (160-180 g) des rats opérés et du diamètre de la sténose. Une sténose totale en un temps entraîne le décès par infarctus intestinal dans 100 % des cas. Une sténose totale de la veine porte peut toutefois être obtenue par ligature en 2 temps, à 48 heures d'intervalle (Koshy et *al.*, 1988).

L'injection intra-portale de microsphères (veine cœcale) entraîne une obstruction du flux porte et est responsable d'une brutale augmentation de la pression portale. Il a été montré que le développement rapide de shut porto-portes permettait d'éviter les lésions d'ischémie et normalisait la pression portale en 15 jours (Jaffe et *al.*, 1994).

D'autres modèles extra-hépatiques dits modèles de fibrose hépatique sont utilisés essentiellement à un but histologique et dont les caractéristiques hémodynamiques ont été peu étudiées.

### **B- Administration chronique d'alcool**

La plupart des espèces animales, et notamment le rat, ont une aversion naturelle pour la prise d'alcool. Par ailleurs, l'apparition de lésions de fibrose et de cirrhose nécessite plusieurs mois d'administration.

Il a été décrit un modèle de fibrose chez des rats recevant des doses d'alcool progressivement croissantes (de 8 à 16 g/kg/j), par gavage, associées à un régime riche en graisses. Au terme de 4 à 7 mois, des lésions de stéatose, de nécrose hépatocytaire, et de fibrose centro-lobulaire avec des septa étaient présentes mais sans véritable cirrhose. Il a également été montré que l'administration d'alcool chez le rat entraînait une augmentation du volume hépatocytaire qui serait corrélé à l'augmentation de la pression intra-hépatique (Orrego et *al.*, 1981).

Des lésions de cirrhose ont été obtenues chez des singes femelles (17 % des animaux traités) recevant pendant 6 ans un régime riche en alcool (50 % de l'apport calorique quotidien) associé à un apport de phosphatidylcholine. De même, chez des singes, l'adjonction de vitamine A à un apport d'alcool quotidien pendant 9 mois était responsable de lésions de stéatose et de cirrhose (régime Lieber-Decarli) (Leo et Leiber, 1983)

### **C- Modèles nutritionnels**

Un régime riche en graisses et carencé en choline et protéines chez des rats permet d'obtenir une cirrhose en 16 à 24 semaines. Mais l'intensité des lésions histologiques est très variable d'un animal à l'autre. Il existe, en outre, une forte spécificité d'espèce de l'action de la choline ne permettant pas une reproductibilité satisfaisante du modèle (Ruwart et *al.*, 1989).

### **D- Modèles immunologiques**

L'administration intrapéritonéale de sérum hétérologue ou d'albumine chez des rats, 2 fois par semaine, pendant 9 semaines, permet d'obtenir une cirrhose sans stéatose ni nécrose hépatocellulaire (Ma et *al.*, 1996).

### **E- Schistosomiase hépatique**

L'injection de cercaires par voie sous-cutanée chez la souris provoque en 5 semaines une HTP avec un syndrome hypercinétique. Les lésions hépatiques sont caractérisées par des granulomes, un infiltrat inflammatoire éosinophile et mononucléé portal et péri-sinusoidal, et des lésions de nécrose de coagulation. La pression portale s'élève progressivement à partir de 7 à 9 semaines d'infection. Il n'existe pas de corrélation entre la pression portale et le contenu hépatique en collagène. Bien que de nombreuses espèces animales puissent être infectées, les shunts porto-systémiques, en moyenne 15 %, ne se développent que chez la souris (Sarin et *al.*, 1991).