



Thèse

2006

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Evolution histologique précoce des lésions de stéatohépatite alcoolique
sévère sous traitement de stéroïdes en association avec un anti-TNF α
versus un placebo

Rougemont-Pidoux, Anne-Laure

How to cite

ROUGEMONT-PIDOUX, Anne-Laure. Evolution histologique précoce des lésions de stéatohépatite alcoolique sévère sous traitement de stéroïdes en association avec un anti-TNF α versus un placebo. Doctoral Thesis, 2006. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:440

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:440>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:440](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:440)

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE

Section de médecine clinique
Département de pathologie clinique
Service de pathologie clinique
Département de médecine interne
Service de gastro-entérologie et hépatologie

Thèse préparée sous la direction de la Doctoresse Laura Rubbia-Brandt, PD,
et du Docteur Laurent Spahr, PD

**Evolution histologique précoce des lésions de stéatohépatite
alcoolique sévère sous traitement de stéroïdes en association
avec un anti-TNF α versus un placebo**

Thèse
présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Anne-Laure ROUGEMONT-PIDOUX

de Genève (GE)

Thèse n° 10490

Genève

2006

RÉSUMÉ	2
INTRODUCTION	3
BASES THÉORIQUES	4
ALCOOL ET APERÇU ÉPIDÉMIOLOGIQUE	4
MÉTABOLISME DE L'ALCOOL	9
PATHOLOGIES HÉPATIQUES LIÉES À L'ALCOOL	13
STÉATOHÉPATITE ALCOOLIQUE	17
IMMUNOLOGIE ET INFLAMMATION	22
TRAITEMENTS DE LA STÉATOHÉPATITE ALCOOLIQUE	27
BUT DE L'ÉTUDE	30
MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
FAISABILITÉ DE L'ÉTUDE	31
DÉFINITION DE LA COHORTE	31
BIOPSIE HÉPATIQUE	33
ANALYSE DES BIOPSIES	33
ANALYSE STATISTIQUE	35
RÉSULTATS	36
DONNÉES AVANT TRAITEMENT	36
ÉVOLUTION APRÈS INTRODUCTION DU TRAITEMENT	41
DISCUSSION	51
CONCLUSION	54
REMERCIEMENTS	55
BIBLIOGRAPHIE	56

RÉSUMÉ

La stéatohépatite alcoolique, complication sévère de l'abus d'alcool, bénéficie d'un traitement de corticostéroïdes; cette étude pilote a pour but d'établir la validité de l'adjonction d'anti-TNF- α à ce traitement de référence.

Un collectif de 20 patients avec stéatohépatite alcoolique sévère confirmée histologiquement a été considéré, avec un bilan d'évolution pratiqué 7 à 10 jours après introduction de corticostéroïdes combinés à un anti-TNF α ou à un placebo.

Cette étude suggère que l'infliximab serait bien toléré par des patients avec insuffisance hépatique sévère. Une diminution statistiquement significative du score de Maddrey, indicateur fiable de la sévérité de l'atteinte hépatique, a pu être observée, de même qu'une diminution de la bilirubine sérique. Une tendance à l'amélioration des lésions histologiques hépatocellulaires s'ébauchait et l'absence de modification significative de l'atteinte inflammatoire est à pondérer avec le décalage temporel existant entre réponse clinique au traitement et évolution histologique des lésions.

INTRODUCTION

La stéatohépatite alcoolique, complication fréquente de l'abus d'alcool, représente avec la cirrhose deux formes sévères d'atteinte hépatique liée à l'intoxication alcoolique. L'incidence de ces deux complications au sein de la population à risque formée par les gros consommateurs d'alcool ("heavy drinkers") est estimée à 20-33% [1]. La gravité de la stéatohépatite alcoolique est attestée par son important taux de mortalité, avoisinant 50% dans la stéatohépatite alcoolique sévère non traitée, définie par un score de Maddrey ("discriminant function") supérieur à 32 [2,3]. Une réduction de la mortalité de 50% à 20% est observée après 4 semaines d'un traitement de corticoïdes [2].

Histologiquement, un infiltrat inflammatoire important, neutrophilique et lymphocytaire, et des phénomènes de souffrance hépatocellulaire et d'apoptose sont au premier plan, évoquant la forte probabilité d'une participation immunologique aux lésions observées et offrant une cible privilégiée à l'action anti-inflammatoire des stéroïdes.

De plus, le TNF- α (tumor necrosis factor- α) est considéré comme un médiateur fondamental de l'inflammation [4], induisant notamment la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhésion cellulaire, dont l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1).

L'étude prospective décrite dans ce travail porte sur un collectif de 20 patients souffrant de stéatohépatite alcoolique sévère, avec score de Maddrey supérieur à 32, chez lesquels le diagnostic clinique a été confirmé histologiquement, à partir d'une biopsie hépatique transveineuse. L'évolution histologique des lésions hépatocytaires et de l'infiltrat inflammatoire, de même que le suivi de certains paramètres cliniques et biologiques, ont été considérés après 7 à 10 jours de traitement combinant des stéroïdes à un anti-TNF- α ou à un placebo. Aucune étude portant sur l'éventuel bénéfice thérapeutique de l'anti-TNF- α dans la stéatohépatite alcoolique n'avait été publiée avant la conduite de celle qui fait l'objet de ce travail.

BASES THÉORIQUES

ALCOOL ET APERÇU ÉPIDÉMIOLOGIQUE

Quelques considérations historiques

Le substantif alcool lui-même est issu d'un terme arabe, "al-kohl", qui signifie "antimoine pulvérisé". Les alchimistes reprendront le radical latin "alko" pour tout produit d'une distillation complète, désignant donc une substance solide ou liquide, volatile, odorante, se dissipant facilement dans l'atmosphère. Le Dictionnaire des Sciences Médicales publié en 1812 auprès de C.L.F. Pancoucke, Editeur, indique que la découverte de l'extraction d'alcool à partir de boissons fermentées est attribuée à Arnauld de Villeneuve, alchimiste du XIV^{ème} siècle [5]. Cependant, le terme "alcohol" n'apparaît en France qu'en 1586 [6].

Ce même dictionnaire résume ainsi les effets de l'alcool: "(...) son abus peut avoir les plus graves inconvénients; l'ivresse en est la première suite, et l'habitude de cet état amène des maladies très sérieuses, comme l'apoplexie, l'hydropisie, une espèce d'hébétéation et d'imbécillité, et quelques fois même une combustion spontanée."

Cependant, l'ivresse est alors considérée comme un vice, un péché et est attribuée avant tout aux "classes laborieuses". Seuls sont reconnus les méfaits des boissons distillées, alors que les boissons fermentées sont réputées bénéfiques !

En 1849, un médecin suédois, Magnus Huss, introduit le terme "d'alcoolisme" et décrit les conséquences de l'absorption répétée d'eau-de-vie comme "un ensemble de manifestations pathologiques du système nerveux, dans ses sphères psychiques, sensitives et motrices qui s'observe chez les sujets qui ont, pendant une période prolongée, bu de manière continue et excessive des boissons alcoolisées". L'ivresse appartient donc désormais au domaine médical et l'alcoolisme apparaît en France en tant que concept en 1866, avec la thèse de M. Gabriel, intitulée "Essais sur l'alcoolisme considéré principalement au point de vue de l'hygiène publique" [6].

La notion de "dangerosité" sera discutée, avec la distinction clinique apportée en 1938 par Duchêne et Dublineau entre *l'alcoolique d'hôpital général* et *le buveur d'hôpital psychiatrique*, qui, bien que confondant dangersités alcoolique et psychiatrique, aura le mérite d'insister sur les mesures prophylactiques et de rééducation [6]. L'opinion publique, secondée par les décisions politiques, privilégiera cependant la répression et la protection de la société par rapport aux mesures médicales, ceci jusqu'à la seconde moitié du XX^{ème} siècle.

Consommation d'alcool : tendances actuelles

En 1999, l'OMS publie un rapport global sur l'alcool [7] qui, sur le plan mondial, classe cette substance au même rang que les habitudes sexuelles à risque, du point de vue des DALYs (Disability Adjusted Life Years), qui recensent le nombre total d'années perdues

au profit d'un décès ou d'un handicap. L'alcool se situe par ailleurs après la malnutrition et les problèmes liés aux conditions sanitaires déficientes et juste avant le tabagisme; il serait même en tête de liste si seules les années de vie avec handicap associé étaient considérées.

La consommation recensée d'alcool est en diminution depuis 1980 dans la majorité des pays développés, alors qu'elle augmente dans les pays en voie de développement et dans les pays de l'ex-URSS. Sans oublier la production domestique ou illégale importante à considérer également dans ces pays à risque.

Selon des chiffres publiés par la Food and Agricultural Organization (FAO) et repris dans le rapport de l'OMS [7], la production globale de bière et de spiritueux augmente régulièrement depuis 1970, alors que la production de vin tend à diminuer.

L'OMS recommande l'utilisation de la consommation d'alcool per capita, pour l'ensemble de la population âgée de plus de 15 ans, sur une période d'une année, comme indicateur de tendances et de l'étendue de la problématique liée à l'alcool. Celle-ci s'obtient en divisant la production nationale cumulée aux importations et hypothéquée des exportations par la population âgée de 15 ans ou plus ou à partir d'estimations dérivées des systèmes de taxation sur l'alcool. Ces méthodes ne tiennent pas compte de la consommation attribuable aux touristes ni de la consommation de résidents à l'étranger. De plus, la production illégale ou domestique, évoquée plus haut, n'est pas non plus quantifiable (elle pourrait atteindre jusqu'à 80% de la production selon les pays).

La Suisse se trouve ainsi en 1996 au 17^{ème} rang d'un classement regroupant 153 pays, avec une consommation per capita de 11.27 litres d'alcool pur, se subdivisant en 6.3 litres de vin, 3.65 litres de bière et 1.81 litres de spiritueux. La France se situe quant à elle en 6^{ème} position. Entre les périodes 1970-1972 et 1994-1996, la consommation suisse per capita a régressé de 18.9%.

De façon plus générale, les pays européens recensent la prévalence de consommation la plus élevée au monde, notamment liée à des différences moins importantes de schéma de consommation entre hommes et femmes, comparativement au reste du monde. Pour la Suisse, l'ISPA (Institut Suisse de Prévention de l'Alcoolisme) annonce en 1993 une prévalence de consommation de 90% chez les hommes et de 77% chez les femmes (chiffres publiés par l'OMS [7]).

Une étude suisse [8] analysant les résultats de recensements effectués par l'Office Fédéral de la Statistique et par l'ISPA et les statistiques fédérales sur la mortalité liée à la cirrhose hépatique insiste cependant sur les différentes tendances de consommation entre hommes et femmes, en Suisse. Au début du 20^{ème} siècle, la Suisse était le deuxième pays, après la France, à plus forte consommation d'alcool per capita, avec 22 litres d'éthanol pur consommés par année par la population âgée de plus de 15 ans. Les courbes comparatives de consommation évoluent parallèlement jusqu'à la Seconde Guerre Mondiale environ, qui correspond, en Suisse comme ailleurs, à une période de "pénurie" d'alcool. Le début des années soixante correspond à une nette augmentation de la consommation, attribuée

essentiellement à des variations dans la consommation masculine de bière. La diminution intervenant dès le milieu des années septante, déjà mentionnée plus haut, ne correspond à aucun signe de baisse de la consommation des femmes.

Définition et conséquences des abus

Les conséquences sociales de la consommation d'alcool ont été évaluées sur une période de 8 ans en Suisse [9], avec séparation selon deux facteurs prédictifs: (1) la quantité d'alcool consommée et (2) la fréquence des épisodes de consommation excessive ou menant à une intoxication aiguë. Cette étude indique que des difficultés d'ordre social sont liées au schéma de consommation (fréquence des événements d'alcoolisation importante) plutôt qu'au volume total d'alcool consommé. A titre d'exemple, des épisodes hebdomadaires de consommation excessive sont associés à un risque quintuplé d'incidents avec la police ou l'autorité et à un risque multiplié par deux à trois de modifications des relations interpersonnelles. Les résultats de l'étude restent stables malgré l'introduction de la quantité consommée dans les calculs statistiques effectués.

Les définitions des abus varient grandement d'un pays à l'autre. La Suisse a fixé le taux de consommation excessive ("heavy drinking") à ≥ 60 grammes par jour [7]. Outre les conséquences sociales, le schéma de consommation générale apporte des indications sur certains effets cliniques et médico-légaux. En effet, une consommation occasionnelle, peu fréquente mais largement abusive, telle qu'elle peut être observée en Irlande, est prélude à des conséquences aiguës de l'alcoolisation, essentiellement des traumatismes et des accidents de circulation. Une consommation importante plus régulière, telle qu'en Espagne, est par contre plutôt prédictive de conséquences médicales à long terme.

Dans un guide international de suivi de la consommation d'alcool [10], l'OMS classe les conséquences aiguës de l'alcoolisation en:

- (1) accidents de circulation liés à l'alcool,
- (2) traumatismes et décès non intentionnels liés à l'alcool,
- (3) suicide,
- (4) violence interpersonnelle.

Les conséquences à long terme listées sont la cirrhose hépatique, les troubles mentaux liés à l'alcool, le syndrome d'alcoolisation foetale, les cancers, les maladies cardiovasculaires et d'autres pathologies chroniques.

En Suisse, des études de population [7] ont montré que 60% des jeunes âgés de 11 et 12 ans et 90% de ceux de 15 ou 16 ans avaient une expérience quelconque de l'alcool (étude effectuée en 1994). Parmi les bénéfices réalisés par l'Alcohol Board sur les boissons distillées, 3% sont versés pour la prévention et 7% pour le traitement des problèmes liés à l'usage d'alcool, de drogues et de médicaments. Sur une population de plus de 7 millions, le nombre de personnes dépendantes de l'alcool est estimé à 150'000.

Le syndrome de dépendance est défini par l'OMS dans la CIM-10 [11] comme "(l')ensemble des phénomènes comportementaux, cognitifs et physiologiques dans lesquels l'utilisation d'une substance psycho-active ou d'une catégorie de substances

entraîne un désinvestissement progressif des autres activités". Le diagnostic de certitude repose sur la présence conjointe, au cours de la dernière année, d'au minimum trois des six critères suivants:

- (1) désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psycho-active,
- (2) difficultés à contrôler l'utilisation de la substance,
- (3) syndrome de sevrage physiologique lors de la diminution ou l'arrêt de la substance,
- (4) mise en évidence d'une tolérance aux effets de la substance,
- (5) abandon progressif d'autres sources de plaisir et d'intérêt au profit de cette substance et augmentation du temps passé à se procurer la substance, la consommer ou récupérer de ses effets,
- (6) poursuite de la consommation de la substance malgré la survenue de conséquences manifestement nocives.

Ce syndrome est différencié de "l'utilisation nocive pour la santé" [11], qui représente un mode de consommation induisant des troubles psychologiques ou physiques. Ce diagnostic ne peut pas être retenu lorsqu'il existe un syndrome de dépendance, un trouble psychotique ou un autre trouble spécifique lié à l'utilisation d'une substance psycho-active.

Cette distinction entre abus et dépendance repose également dans le DSM-IV-TR [12] sur la présence ou l'absence d'une tolérance ou de symptômes de sevrage.

D'autres concepts intègrent trois degrés dans la pathologie alcoolique, la notion de buveur asymptomatique ("asymptomatic drinker") précédant les plus classiques abus et dépendance [13], avec une consommation peut-être abusive, mais n'ayant pas encore entraîné de conséquences négatives.

Marqueurs sériques

Le dépistage de la pathologie alcoolique s'appuie sur des tests biologiques, qui comprennent le dosage de l'alcoolémie, la perturbation de tests hépatiques (γ GT, ASAT ALAT), la présence d'anomalies érythrocytaires et une valeur de CDT augmentée.

La γ GT (γ -glutamyl transferase) est une enzyme d'origine hépatique, dont la synthèse est induite par l'alcool et qui est, selon certaines séries rapportées [14], augmentée chez 80-90% des alcooliques chroniques.

Le taux d'ASAT (aspartate aminotransferase) est le reflet de l'atteinte hépatocellulaire, sans être un indicateur fiable de la sévérité globale de la pathologie hépatique. Cette enzyme est également augmentée lors de pathologies hépatobiliaires sans lien avec l'alcool et lors d'atteinte du muscle squelettique ou cardiaque.

Le rapport sérique ASAT/ALAT (alanine aminotransferase) est utilisé comme indicateur de l'étiologie de la pathologie hépatique. Ce rapport serait supérieur à 1 chez 80-90% des individus présentant une maladie alcoolique du foie et supérieur à 2 chez 70% des individus atteints de stéatohépatite alcoolique ou de cirrhose alcoolique active [14].

La CDT (carbohydate-déficient transferrin) correspond aux isoformes désialysées de la transferrine sérique, reflétant la perte des trisaccharides terminaux. Ce marqueur est actuellement un indicateur préférentiel du suivi de l'abstinence, bien que des faux positifs puissent être obtenus lors d'un certain nombre de pathologies chroniques du foie ou lors de déficit en fer, par exemple.

L'observation d'une macrocytose est fréquente lors d'abus d'alcool et serait due à un effet toxique direct sur les érythrocytes en voie de maturation [14].

L'intérêt de tous ces marqueurs réside également dans leur capacité à se normaliser après l'arrêt de l'ingestion d'alcool; ils sont, par conséquent, utiles dans le suivi du patient. Toutefois, ces marqueurs, peu spécifiques, sont à considérer comme des indicateurs, alors que la biopsie hépatique constitue le "gold standard".

MÉTABOLISME DE L'ALCOOL

Le foie est particulièrement sensible aux lésions induites par l'alcool, étant le site primaire de son métabolisme, avec plus de 90% de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde intervenant dans cet organe; seuls 5% de l'éthanol, non oxydé, sont excrétés dans l'haleine ou dans l'urine [15]. Selon certaines études épidémiologiques, une dose seuil d'alcool doit être consommée avant que des lésions hépatiques sévères ne deviennent évidentes. Pour les hommes, cette quantité correspondrait à une consommation quotidienne de 5-6 boissons standard durant 20 ans, alors que chez les femmes, le seuil serait établi au quart ou à la moitié de cette quantité. Par définition, une boisson standard contient 10 g d'alcool. Cependant, une stéatohépatite alcoolique ou une cirrhose se développerait chez moins de 50% de ces "heavy drinkers" [16].

Les facteurs pouvant influencer la susceptibilité individuelle à l'alcool comprennent l'âge, le sexe, l'état de nutrition, la coexistence de certaines habitudes (tabagisme) ou pathologies (hépatite chronique virale B ou C) et l'origine ethnique (l'élimination de l'éthanol varierait d'un facteur 2 à 3 selon les populations considérées) [17].

L'hépatocyte contient 3 voies permettant le métabolisme de l'alcool (*cf. Figure 1*):

- (1) la voie de l'alcool deshydrogénase (ADH),
- (2) le système microsomal (MEOS : microsomal enzyme oxidizing system), représenté par l'enzyme P450E1 (CYP2E1),
- (3) la voie de la catalase.

Toutes trois résultent en une production d'**acétaldéhyde**, métabolite hautement toxique.

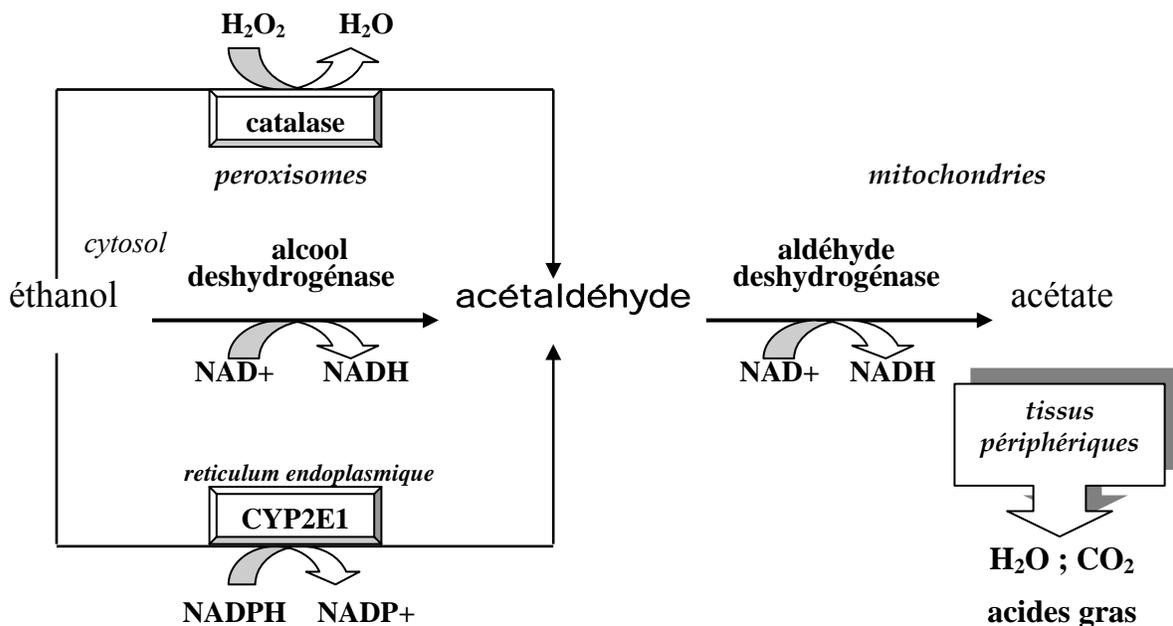


Figure 1. Voies du métabolisme de l'alcool (d'après [1] et [15]).

Voie de l'alcool deshydrogénase (ADH)

L'oxydation de l'éthanol par la voie de l'ADH produit de l'acétaldéhyde, tout en perdant un équivalent H⁺, qui réduira le NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) en NADH. Des troubles métaboliques sont consécutifs à cette importante production d'équivalents réducteurs, qui dépassent les capacités de maintien de l'homéostasie de l'hépatocyte. En particulier, l'augmentation de NADH promeut la synthèse des glycérolipides et empêche l'oxydation des lipides, résultant en une accumulation nette de graisse [1,18]. Les résultats de certaines études [19] indiqueraient même qu'un haut rapport isolé de NADH/NAD⁺ serait suffisant pour induire le développement d'une stéatose.

L'ADH est une métalloenzyme dépendant du zinc pour son activité métabolique, se subdivisant en 5 classes de molécules dimériques [18]. Le polymorphisme génétique de cette enzyme explique en partie les variations interindividuelles de réponse à l'alcool. En effet, le risque d'abus et d'alcoolisme est fortement diminué chez les individus possédant les gènes codant pour l'ADH de haut degré d'activité (β 2 ADH, codée par l'*ADH2*2*) ou l'allèle négatif dominant de l'aldéhyde deshydrogénase ALDH2 (*ALDH2*2*). Dans ces deux cas de figure, une augmentation du taux de formation de l'acétaldéhyde ou, respectivement, une diminution de sa clearance explique l'aversion ressentie pour les boissons alcoolisées [19], l'élévation de l'acétaldéhyde sérique provoquant une libération de catécholamines, qui à leur tour induisent un érythème facial et une tachycardie [1]. L'allèle *ALDH2*2*, forme mutante et inactive sur la plan catalytique, est présent dans environ 50% de la population d'origine chinoise ou japonaise et aurait récemment été identifié chez 20% des Israéliens [19]. C'est d'ailleurs l'aldéhyde deshydrogénase qui est la cible du disulfiram (Antabus). La forme *ADH2*2* apparaît avec une fréquence de 20% dans la population suisse et de 90% environ dans les populations mongoloïdes [20].

Système microsomal (MEOS : microsomal enzyme oxidizing system)

L'enzyme impliquée dans ce système, le cytochrome P450E1 (CYP2E1), peut être induite par la présence d'alcool; des valeurs augmentées d'un facteur 4 à 10 ont été retrouvées dans les biopsies hépatiques d'individus ayant récemment consommé de l'alcool [18]. Cette voie métabolique, accessoire dans des conditions habituelles, prendrait donc plus d'importance en présence d'une consommation chronique importante ou de taux élevés d'éthanol.

Cette enzyme, en plus de son implication dans la transformation d'éthanol en acétaldéhyde, catalyse la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) et de radicaux libres dérivés de l'éthanol (hydroxyethyl free radicals). Les radicaux libres sont responsables de la peroxydation des lipides associée à l'éthanol [21]; l'interaction lipides-radicaux libres induit la formation de peroxydes, instables et réactifs, qui provoquent des lésions massives des membranes, des organelles et des cellules en général [22].

Une relation linéaire a été observée entre le contenu en CYP2E1 des microsomes de rats nourris à l'éthanol intragastrique (modèle de Tsukamoto-French) et leur capacité à former

des radicaux hydroxyéthyl. Un traitement préalable par deux composés inhibant l'induction du CYP2E1 par l'alcool résulte en une nette diminution de la synthèse de ces radicaux [23]. L'importance de ce système enzymatique dans la synthèse de radicaux libres a cependant été contestée par des études faisant intervenir des souris knock-out (*cf. chapitre Endotoxines et cellules de Kupffer*).

Les mécanismes cellulaires de défense permettant d'éliminer les radicaux libres comprennent les anti-oxydants et en particulier la glutathione. Or, l'éthanol inhibe la synthèse de glutathione sous sa forme réduite, participant par ce biais également à la peroxydation des lipides [20]. Chez les patients cirrhotiques, une déplétion hépatique en α -tocophérol, un antioxydant majeur, potentialise ces effets [24]. Les radicaux hydroxyéthyl interviennent eux aussi par le biais d'une diminution des antioxydants hépatiques dans la genèse des lésions liées au stress oxydatif [23].

De plus, l'induction de l'activité de l'enzyme CYP2E1 s'étend au métabolisme de nombreux médicaments, dont elle augmente ainsi la clearance [20]. Ceci explique la vulnérabilité accrue des gros consommateurs d'alcool à certains solvants industriels, anesthésiants, analgésiques courants (tel que l'acétaminophène), drogues (cocaïne), ou à certaines vitamines (rétinol). L'induction de la CYP2E1 augmente également la sensibilité à des carcinogènes chimiques et accroît le potentiel mutagène des produits dérivés du tabac [24].

Voie de la catalase

La catalase est une hémoprotéine localisée dans les peroxisomes. Cette voie, qui dépend de la présence de H_2O_2 , n'assurerait que 2% environ de l'élimination de l'éthanol, *in vivo* [1].

Différences de susceptibilité liées au sexe

Les lésions hépatiques, qu'il s'agisse de stéatohépatite ou de cirrhose, se développent plus rapidement et à la suite de l'ingestion de quantités moindres d'alcool chez les femmes [25]. L'incidence de cirrhose serait significativement augmentée lors d'une consommation quotidienne de 40 à 60 grammes d'alcool chez les hommes et de 20 grammes seulement chez les femmes. En effet, une consommation modérée d'alcool se définit comme l'ingestion quotidienne de deux boissons standard au maximum chez l'homme, mais de seulement une boisson standard quotidienne chez la femme [24].

Les taux sanguins, pour une quantité donnée d'alcool, sont plus élevés chez les femmes, en raison de leur masse corporelle inférieure et d'un volume de distribution moins important, consécutif à une proportion de masse adipeuse plus élevée [24]. Puisque l'alcool se distribue dans le volume aqueux corporel total, le volume de distribution est plus important chez l'homme que chez la femme [25]. De plus, la concentration d'alcool dans l'air expiré demeure significativement plus basse chez les femmes, après ajustement de la dose d'alcool ingérée aux paramètres anthropométriques de poids corporel et de volume de distribution [25].

Un effet de "premier passage" (gastrique ou hépatique) intervient également dans les différences observées entre les deux sexes. En effet, des études comparant les concentrations sanguines d'alcool après administration intraveineuse et suite à une ingestion *per os* montrent que la différence entre ces deux concentrations, qui correspond aux effets de premier passage, est plus faible chez les femmes, et ceci de façon significative. Cependant, cette différence dans l'effet de premier passage n'était observée qu'avec des concentrations d'alcool de 10% et de 40%, équivalant respectivement à des alcools de type vin et whisky, mais non après dilution de l'alcool jusqu'à obtention d'une solution à 5%, correspondant à la concentration de certaines bières [26]. L'activité gastrique de l'une des trois classes d'isoenzymes de l'ADH, la χ -ADH, est également réduite de 58% chez les femmes, par rapport aux individus de sexe masculin, ce qui accroît la biodisponibilité de l'éthanol. En combinaison avec la réduction de l'effet de premier passage et l'activité réduite de la χ -ADH, un taux d'oxydation hépatique de l'alcool plus élevé chez les individus féminins induit une production plus importante de dérivés hépatotoxiques, tels que l'acétaldéhyde et les radicaux libres, contribuant ainsi à la plus grande vulnérabilité des femmes aux effets de l'éthanol [26].

L'effet des oestrogènes a également été impliqué comme facteur permettant d'expliquer la sévérité accrue des lésions hépatiques dues à l'ingestion d'alcool chez les femmes. Des études menées avec des rats femelles ayant subi une annexectomie développent des lésions hépatiques induites par l'alcool moins sévères que des rats femelles contrôle. Par contre, l'introduction d'une substitution hormonale augmente la sévérité des lésions hépatiques, qui deviennent alors similaires à celles observées chez les rats femelles contrôle [27]. D'autres études, également réalisées sur des rats femelles, ont montré que les oestrogènes accroissent la toxicité des endotoxines par différents mécanismes, bien que le facteur limitant de ces études réside dans l'utilisation de fortes doses d'oestrogènes, suffisantes à induire une suppression de l'ovulation [28]. Les trois mécanismes décrits étaient les suivants:

- (1) les oestrogènes réduisent les taux sériques de lipoprotéines, diminuant ainsi la disponibilité d'une voie importante de neutralisation des endotoxines,
- (2) les oestrogènes pourraient accroître l'expression de CD14 à la surface des macrophages, augmentant la capacité de liaison de ces cellules avec les endotoxines, ce qui induit une production de TNF- α et d'autres cytokines pro-inflammatoires, bien que ce mécanisme soit contesté par d'autres études [29],
- (3) les oestrogènes accroissent la synthèse de la protéine de liaison des lipopolysaccharides (LBP), qui facilite la transduction des lipopolysaccharides (LPS) dans des voies de signalisation (toxiques), favorisées par les mécanismes (1) et (2), et de non-signalisation (neutralisantes) [28].

Par ailleurs, l'administration d'un antagoniste non hépatotoxique des récepteurs aux oestrogènes, le toremifene, à des rats femelles a permis une réduction significative des lésions hépatiques d'inflammation et de nécrose induites par une consommation de doses toxiques d'alcool. De plus, le toremifene conférait un effet protecteur supplémentaire en réduisant d'une part l'induction par l'éthanol de l'enzyme pro-oxydante CYP2E1 et en minimisant d'autre part la réduction de la Se-glutathione-peroxidase, enzyme participant à la protection contre l'oxydation [29].

PATHOLOGIES HÉPATIQUES LIÉES À L'ALCOOL

Les lésions hépatiques consécutives à la consommation d'alcool se regroupent sous le terme d'**ALD** ("alcoholic liver disease") et comprennent:

- (1) la stéatose hépatique,
- (2) la stéatohépatite alcoolique,
- (3) la cirrhose,
- (4) le carcinome hépatocellulaire.

Répartition zonale des lésions

Les lésions hépatiques en lien avec la consommation d'alcool débutent dans la région péri-centrolobulaire, dite zone 3 (*cf. Figure 2*). Cette répartition zonale des lésions, associée à des différences de vulnérabilité, a été expliquée par plusieurs mécanismes et s'appuie sur la division du lobule hépatique en trois zones virtuelles distinctes.

En effet, des anticorps anti-"acétaldehyde adducts" ont été retrouvés préférentiellement dans la région péri-centrolobulaire et le CYP2E1 est exprimé, de façon constitutive et induite, dans les trois à quatre premières couches cellulaires entourant les veinules hépatiques terminales. De plus, les hépatocytes péri-centrolobulaires rétablissent leur contenu en glutathione plus lentement que les cellules isolées des régions périportales. Enfin, une théorie impliquant un déficit en oxygène a été avancée, reposant sur un accroissement de son gradient de pression le long des sinusoides, secondaire à l'état hypermétabolique induit par l'alcool. Il en résulterait une anoxie au niveau des cellules péri-centrolobulaires [21].

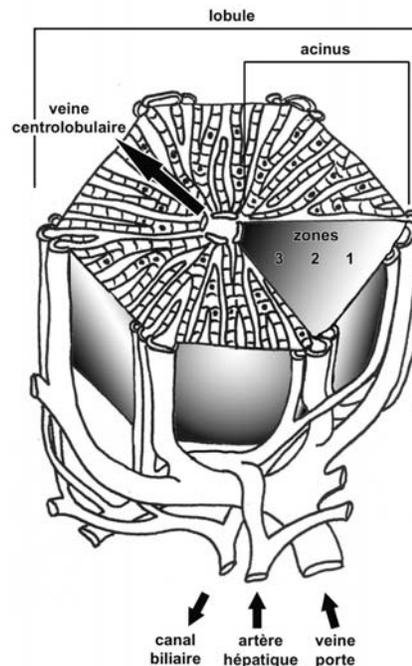


Figure 2. Répartition zonale des lésions hépatiques (adapté de [22] et [30]).

Stéatose hépatique

L'accumulation de lipides dans le foie n'est pas indispensable au diagnostic d'ALD, bien que la stéatose représente la lésion histologique la plus précoce et la plus régulièrement associée à la consommation d'alcool. Les dépôts lipidiques intrahépatocytaires prennent soit un aspect macrovacolaire, avec un unique globule intracellulaire pouvant induire un déplacement du noyau en périphérie, soit un aspect microvésiculaire, avec de multiples gouttelettes, habituellement disposées autour du noyau. Cette accumulation lipidique se concentre essentiellement dans les zones 3 et 2 de l'acinus. L'abstinence d'alcool rétablit l'homéostasie redox; les lipides en excès sont mobilisés et la stéatose se résorbe, en 2 à 6 semaines [31,32].

Des lipogranulomes peuvent se former après rupture d'un hépatocyte chargé en lipides, avec des cellules inflammatoires lymphomonocytaires, et notamment des cellules de Kupffer, entourant une gouttelette lipidique extracellulaire.

L'augmentation du rapport NADH/NAD consécutif au métabolisme de l'éthanol influence fortement le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides. La glyconéogenèse est altérée et on note un accroissement de la cétogenèse et de la production d'acides gras. Ceci, en conjonction avec une inhibition de la β -oxydation des acides gras au sein des mitochondries, conduit au développement de la stéatose [33].

Plusieurs études prospectives ont conclu que la sévérité et la répartition de la stéatose sont prédictifs du risque ultérieur de fibrose et de cirrhose; la stéatose pourrait ainsi avoir un rôle direct dans la progression vers une pathologie plus sévère. En effet, la présence d'une accumulation lipidique sensibilise le foie à certains mécanismes induisant une inflammation et une nécrose, à savoir le stress oxydatif, les endotoxines, l'hypoxie et la réponse immune aux "protein adducts" (*cf. infra*) [33].

Stéatohépatite alcoolique

La présence des éléments suivants est **nécessaire** au diagnostic:

- (1) lésions hépatocellulaires:
ballonisation hépatocytaire, avec éventuelle apoptose surajoutée,
- (2) infiltrat inflammatoire:
prédominance habituelle de polymorphonucléaires neutrophiles,
- (3) distribution centrolobulaire des lésions.

Certains des éléments suivants, fréquents sans être obligatoires au diagnostic, seront développés dans le chapitre suivant:

- (1) stéatose,
- (2) corps de Mallory,
- (3) fibrose péricellulaire, donnant un aspect en "chicken-wire",
- (4) endofibrose des veines hépatiques,
- (5) corps apoptotiques (anciennement corps de Councilman),

- (6) hépatocytes "induits", granulaires:
présentant une prolifération du reticulum endoplasmique lisse,
- (7) oncocytes (hépatocytes granulaires et oxyphiles):
riches en mitochondries de taille normale,
- (8) mégamitochondries,
- (9) bilirubinostase [31].

Fibrose et cirrhose alcoolique

La fibrose hépatique représente un processus de réparation, dans un contexte d'agression. Son retentissement clinique s'explique par ses implications sur le flux sanguin, à savoir le développement d'une hypertension portale et la diminution des échanges transcapillaires [33], et par les troubles de la fonction hépatique qu'elle induit.

La fibrose peut être de degrés divers, la formation de larges nodules de régénération étant fréquemment ralentie par un effet inhibiteur probable de l'alcool. Initialement, la cirrhose est de type micronodulaire et les septa fibreux contiennent des PMN (polymorphonucléaires neutrophiles), des lymphocytes, des macrophages et quelques plasmocytes. Si la stéatohépatite alcoolique persiste, ses effets sont plus prononcés en périphérie des nodules et la prolifération néoductulaire est manifeste, comme dans toute cirrhose, quelle qu'en soit l'étiologie. Un aspect mixte, micro- et macronodulaire, se développe à mesure que l'hyperplasie compensatrice s'accroît dans certains nodules [31].

La cirrhose peut se développer en l'absence d'évidence d'épisodes préalables de stéatohépatite alcoolique. Il semble en effet qu'indépendamment de phénomènes de nécrose ou d'inflammation, les cellules de Ito (cellules étoilées hépatiques), cellules principales du stockage des rétinoïdes, se transforment en myofibroblastes [24,34]. Les cellules de Ito sont initialement activées, avec augmentation de taille cellulaire, prolifération locale, induction de la fibrinogenèse et expression de certaines caractéristiques des cellules musculaires lisses. Ces cellules sont ensuite initiées, avec nouvel accroissement de la taille cellulaire et augmentation de la sensibilité aux cytokines induisant prolifération et fibrinogenèse. La prolifération est surtout induite par le PDGF (platelet-derived growth factor) et le médiateur le plus puissant de la fibrinogenèse est le TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1); le TNF- α aurait également un rôle dans ce dernier phénomène [24]. Lors de consommation d'alcool, l'acétaldéhyde stimule la production de collagène, par activation transcriptionnelle des cellules de Ito, et les produits de la peroxydation des lipides perpétuent la fibrinogenèse. La fibrose, initialement centrolobulaire, se caractérise par une augmentation des composantes de la matrice extracellulaire, puis peut s'étendre en péricapillaire. De façon précoce, des dépôts de collagène et de fibronectine se forment dans l'espace péricapillaire de Disse, qui s'étend entre le versant anti-luminal des cellules endothéliales bordant les sinusoides et la membrane cellulaire des hépatocytes. Cette capillarisation du sinusoides hépatique, se traduisant par le passage d'un endothélium fenestré à un endothélium continu, est associée à un dysfonctionnement hépatocellulaire, avec retentissement clinique [34].

Il est à noter que les tests biologiques seuls sont insuffisants à quantifier le degré de fibrose, lequel nécessite, tout comme le diagnostic de stéatohépatite, une évaluation par une ponction-biopsie hépatique.

Carcinome hépatocellulaire

Le virus de l'hépatite B représente un facteur étiologique important dans la carcinogenèse du carcinome hépatocellulaire. Dans les zones géographiques où ce virus n'est pas prévalent, notamment en Europe du Nord, le carcinome hépatocellulaire se développe dans 85-90% des cas sur un terrain cirrhotique, qui représente une véritable précancérose. Ce cancer est également fortement associé aux infections chroniques par le virus de l'hépatite C, à la consommation d'alcool ou à l'hémochromatose primaire. La stimulation de la division hépatocellulaire, associée à des phénomènes récurrents de nécrose et d'inflammation, semble au centre de la pathogénie [22].

Les macronodules, définis comme étant d'une taille une fois et demi supérieure aux autres nodules du foie cirrhotique en question ou comme tout nodule dont le grand axe avoisine ou dépasse 1 cm, sont les plus susceptibles d'abriter un carcinome hépatocellulaire, selon un mode de développement d'un "nodule au sein d'un nodule".

Ainsi, l'hépatocyte constitue la cellule d'origine de cette tumeur. Selon le degré de différenciation de la tumeur, des foyers de biliogenèse ou de stéatose peuvent être visibles. Certaines cellules peuvent être ballonisées ou contenir des accumulations intracytoplasmiques éosinophiles et amorphes, de type corps de Mallory.

STÉATOHÉPATITE ALCOOLIQUE

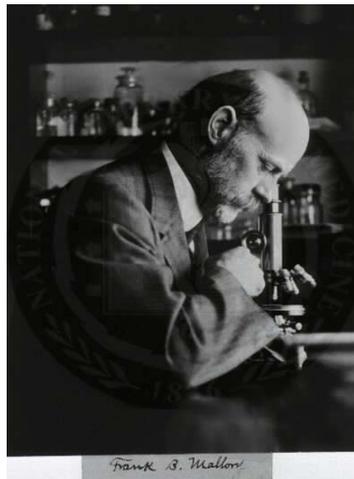
Les principales caractéristiques de la stéatohépatite alcoolique, citées dans le précédent chapitre, sont développées ici.

Ballonisation

Il s'agit d'un signe histologique de souffrance hépatocellulaire, qui intéresse parfois un secteur donné. Les cellules ballonnées apparaissent agrandies, arrondies, leur cytoplasme est pâle et granulaire. La ballonisation résulte de l'accumulation anormale de lipides, d'eau et de protéines [22,31,33]. Cette atteinte pourrait être réversible et ne correspondrait donc pas à une nécrose.

Corps de Mallory

Ces inclusions hépatocytaires ont été initialement décrites par Frank B. Mallory en 1911, dans un chapitre illustrant la cirrhose alcoolique, comme une forme de nécrose particulière, semblant caractéristique de l'atteinte chronique et progressive de ce type de cirrhose. "The cytoplasm of the cells first undergoes a degenerative change in consequence of which an irregular, coarse, hyaline meshwork appears in it. This meshwork stains deeply with eosin and with phosphotungstic acid hematoxylin (...)" [35].



En microscopie électronique, les corps de Mallory apparaissent comme des éléments ultrastructurels filamenteux, sans membrane limitante. Des cytokératines, l'ubiquitine, une protéine se liant à divers éléments insolubles du cytosquelette, et un élément de haut poids moléculaire représentent les composantes majeures des corps de Mallory. Leur conformation est altérée et ces différents éléments sont intimement liés, par l'action vraisemblable d'une transglutaminase [36]. Les corps de Mallory de la stéatohépatite alcoolique disparaissent un à trois mois après l'arrêt de la consommation d'alcool. Ces formations sont chimiotactiques pour les neutrophiles. Toutefois, les cellules contenant des corps de Mallory sont viables et ne semblent pas préférentiellement destinées à une nécrose [37].

Les mécanismes favorisant la genèse de ces inclusions restent hypothétiques; les radicaux libres ou une déficience du métabolisme de certaines protéines pourraient être impliqués. La présence de corps de Mallory pourrait influencer le taux de mortalité selon certains auteurs, bien que cette notion soit encore débattue; leur formation n'est pas liée à la quantité d'alcool consommée [38].

Polymorphonucléaires neutrophiles

Les infiltrats de PMN sont intimement liés aux hépatocytes nécrotiques ou contenant des corps de Mallory, comme Frank B. Mallory lui-même l'avait relevé: "after the hyaline change has reached a certain degree of intensity the cells are surrounded and invaded by numerous polymorphonuclear or endothelial leukocytes (...)" [35]. Ces cellules inflammatoires s'arrangent fréquemment autour des hépatocytes lésés [31].

La production de TNF- α et de chimiokines est accrue dans la stéatohépatite alcoolique. A leur tour, le TNF- α et l'IL-1 induisent une augmentation de molécules d'adhésion, notamment à la surface des hépatocytes et des PMN. Par induction d'une interaction intercellulaire, ce phénomène entraîne des effets cytotoxiques, avec apparition de lésions hépatocytaires ou endothéliales médiées par les PMN. La nécrose des hépatocytes stimule l'invasion par de nouveaux PMN, qui augmentent l'inflammation par effet de feed-back positif. De plus, les PMN circulants sont activés lors de stéatohépatite alcoolique, ce qui provoque également une augmentation du TNF- α et d'IL-8, contribuant en boucle à la cytotoxicité hépatocyttaire et à l'apoptose [38].

Lymphocytes

Plusieurs observations soulignent l'implication des lymphocytes T cytotoxiques dans le développement des maladies hépatiques chroniques liées à l'alcool. Il s'agit de la distribution et de la persistance d'un infiltrat lymphocytaire T CD4+ et CD8+, de l'augmentation de l'expression d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I et II à la surface des hépatocytes, ainsi que du lien établi entre infiltration lymphocytaire et nécrose hépatocellulaire. En effet, un modèle murin transgénique, exprimant des protéines du virus de l'hépatite B, développe des lésions hépatiques sévères et une insuffisance hépatique à la suite d'une inoculation avec des lymphocytes T CD8+ antigène-spécifiques. De même, chez l'être humain, les effets pathologiques de l'infection par le virus de l'hépatite C ont été mis en relation avec des lymphocytes T CD8+ antigène-spécifiques. L'hépatotoxicité de ces lymphocytes T est exprimée à travers la production de cytokines cytotoxiques, dont le TNF, de même que via des mécanismes lytiques plus directs recourant aux perforines et à une expression de surface de Fas-ligand (*cf. paragraphe Mécanismes effecteurs de l'apoptose*) [39,40].

Le TNF- α est un médiateur critique de l'induction des lymphocytes T cytotoxiques, CD8+, lesquels répriment l'action des lymphocytes B auto-réactifs, et par conséquent suppriment l'auto-immunité de type humoral. Des anticorps antinucléaires et anti-dsDNA ont en effet été observés chez des patients traités par anti-TNF- α . De même, de rares patients recevant ce traitement ont développé un lupus érythémateux systémique [41].

Fibrose péricellulaire

De distribution péricentrolobulaire, cette fibrose caractéristique de l'atteinte alcoolique se compose de dépôts de fibres collagène le long des sinusoides et englobant des hépatocytes d'aspect habituel ou ballonnés, induisant un aspect en réseau ("chicken-wire"). Des rosettes sont visibles si ces hépatocytes sont organisés en petits groupes.

Apoptose et Nécrose

L'apoptose représente l'exécution d'un programme de mort cellulaire et se caractérise par des changements nucléaires caractéristiques, à savoir la condensation du noyau, la dégradation de l'ADN, puis une fragmentation nucléaire. Ce phénomène, hautement conservé au cours de l'évolution, provoque l'élimination d'une cellule particulière, qui se sépare de ses voisines, se contracte plutôt qu'elle ne gonfle. L'apoptose n'induit pas de lésion du micro-environnement cellulaire environnant et permet le maintien d'un équilibre entre perte et gain cellulaire [42,43]. L'apoptose est un phénomène rapide, se terminant après quelques minutes ou quelques heures par la phagocytose des corps apoptotiques, anciennement appelés dans le foie "corps de Councilman" [42].

Par opposition, la nécrose, ou "nécrose oncocytaire", est le plus souvent la conséquence d'un désordre métabolique induisant une déplétion en ATP et se produit par exemple lors de lésions d'ischémie/reperfusion ou d'hépatotoxicité médicamenteuse aiguë. Rapidement, cette dernière provoque des altérations du cytosquelette, qui à leur tour induisent la formation de petits bourgeonnements de la membrane cellulaire, ou "blebs", accompagnés de l'initiation d'un gonflement cellulaire. Le stade suivant, appelé métastable, est caractérisé notamment par une dépolarisation mitochondriale, une destruction des lysosomes et des changements ioniques, et se termine par la rupture d'un bourgeonnement membranaire, événement final précipitant la mort de la cellule [43].

Ces deux modes de mort cellulaire co-existent dans la pathologie hépatique et pourraient représenter des phénomènes interdépendants, résultant de l'activation de voies de signalisation communes. Elles peuvent également être considérées comme des résultantes alternatives des mêmes voies de mort cellulaire, ce qui est en particulier illustré par les mécanismes de mort cellulaire secondaires aux modifications de la perméabilité de la membrane mitochondriale (*cf. ci-dessous*) [43].

Mécanismes effecteurs de l'apoptose

L'interaction entre un ligand (TNF- α , TRAIL [TNF-related apoptosis-inducing ligand], FasL [Fas ligand]) et un "death receptor" induit l'initiation de l'apoptose par l'activation de la voie dite extrinsèque, aboutissant à une cascade d'activation des caspases et à l'apoptose. Les "death receptors" sont des protéines transmembranaires de la superfamille des récepteurs TNF/nerve growth factor. Leurs plus importants représentants dans le foie sont TNFR1 (TNF receptor 1), Fas (CD95/APO-1), TRAIL-R1 et -R2 (TRAIL receptor 1 [Death receptor 4/DR4] et TRAIL receptor 2 [DR5/Killer/TRICK2]), death receptor 3 (DR3/Apo-3/TRAMP/WSL-1/LARD) et death receptor 6 (DR6) [43].

La liaison de TNF α avec son récepteur TNFR1 induit la formation du complexe I comprenant TRADD (TNFR-associated protein with death domain), RIP (receptor-interacting protein) et TRAF-2 (TNF-associated factor-2). Ce complexe active JNK (c-jun N-terminal kinase) et NF- κ B (nuclear factor- κ B). Cette dernière protéine induit la transcription de plusieurs gènes de survie, codant notamment des protéines anti-apoptotiques [43]. NF- κ B est lié dans le cytoplasme à son inhibiteur, I κ B. La dégradation de l'inhibiteur permet la translocation de NF- κ B dans le noyau et la transcription des gènes cible, aboutissant à une protection de la cellule envers l'apoptose [4]. Le NF- κ B induit également les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) et d'autres molécules anti-apoptotiques, telle que la MnSOD (manganese superoxide dismutase). Paradoxalement, le TNF- α et le stress oxydatif sont des inducteurs puissants du NF- κ B. Une hypothèse proposée est celle d'une limitation des capacités de liaison à l'ADN de cette protéine, bloquant l'induction de facteurs anti-apoptotiques, consécutive à son oxydation lors de stress oxydatif prolongé. De plus, la capacité de liaison du NF- κ B nécessite la présence de NADPH, consommé durant l'oxydation de l'éthanol par la CYP2E1 [44]. Le complexe I est ensuite modifié et forme le complexe II ou DISC (death-inducing signaling complex). DISC recrute FADD (Fas-associated death domain) et active la pro-caspase-8. A son tour, la caspase-8 (aspartate-specific cysteine protease) active induit les caspases effectrices, dont les plus importantes dans le foie sont les caspases-3 et -7 [43,45].

De même, FasL se lie au récepteur Fas et TRAIL aux récepteurs TRAIL-R1/R2, induisant la formation du DISC, le recrutement de FADD et la liaison à la procaspase-8. Les protéines effectrices caspases-3 et -7 activent également d'autres caspases, augmentant les processus apoptotiques, induisent des dislocations structurelles ou encore inactivent des facteurs anti-apoptiques (membres de la famille bcl-2, voir ci-dessous) [46].

L'ensemble de ces interactions ligand-récepteur forme la voie de type 1. De plus, dans la voie de type 2, induite notamment par le stress oxydatif, la caspase-8 scinde Bid, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl2. La forme tronquée, tBid, provoque un changement de la perméabilité de la membrane mitochondriale (MPT: mitochondrial permeability transition), ayant pour effet une libération de cytochrome c. Celui-ci se lie à l'Apaf-1 (apoptosis-activating factor-1), ce qui permet l'activation de la caspase-9 et la convergence vers les caspases effectrices décrites dans la 1^{ère} voie [42,43]. Lors d'une dysfonction sévère et prolongée des mitochondries, les taux d'ATP diminuent. Lorsque la déplétion en ATP atteint un seuil critique, l'activation des caspases est bloquée et il en résulte un phénomène de nécrose cellulaire. En effet, l'activation de la caspase-3, caspase effectrice de l'apoptose mais n'intervenant pas dans la nécrose, nécessite de l'ATP [43].

Les principaux aspects de ces voies effectrices sont résumés dans la *Figure 3*.

Les protéines de la famille de Bcl2 agissent comme régulateurs de l'apoptose. Certaines sont pro-apoptotiques, telles que bid, bax ou bad, d'autres, tout comme la famille des IAP, ont des effets anti-apoptotiques (bcl-2, bcl-x_L, mcl-1). Les membres de la famille Bcl2 peuvent se lier mutuellement et contrôler leurs actions respectives [42,47].

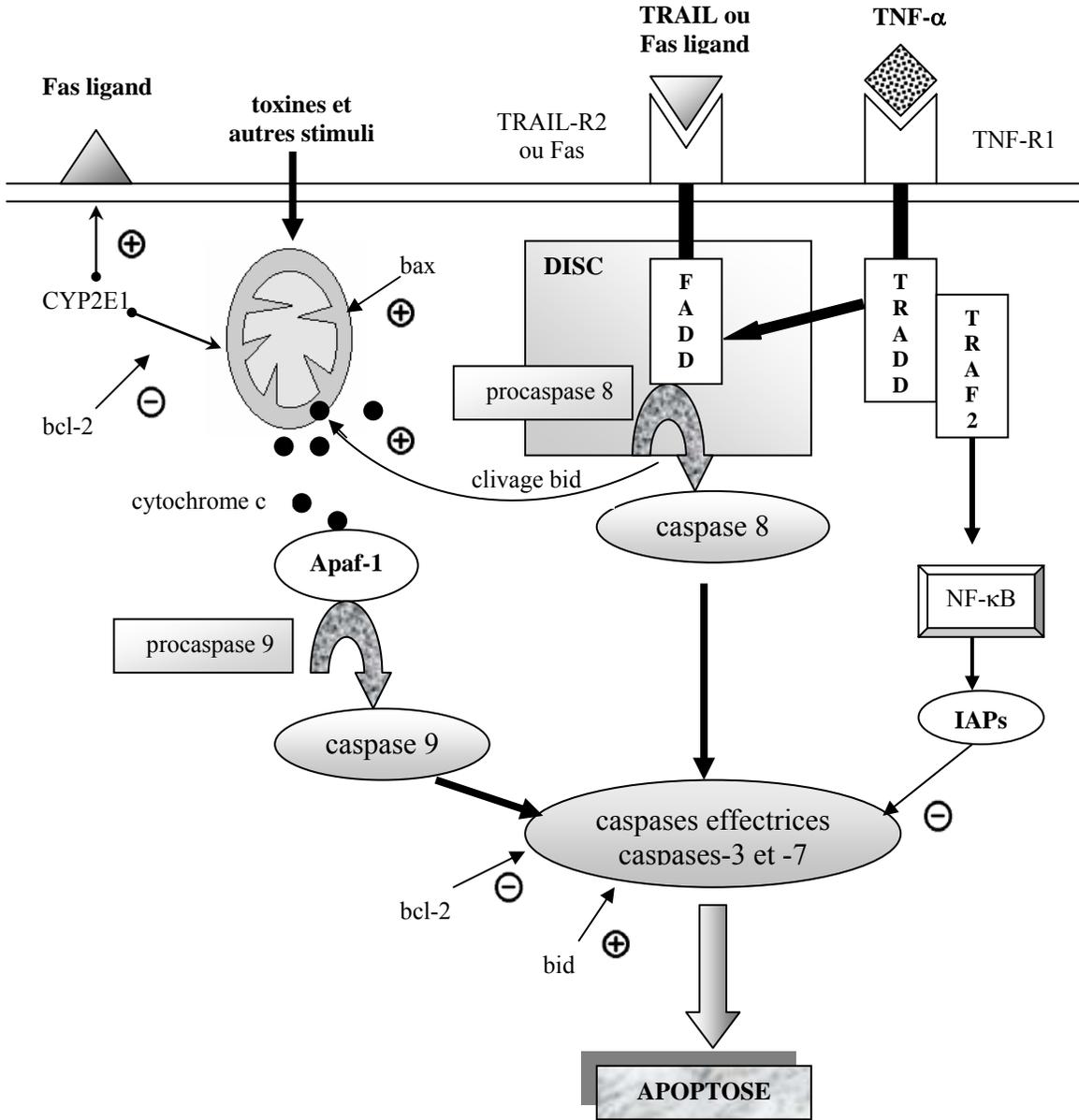


Figure 3. Voies de l'apoptose dans l'hépatocyte (adapté de [4,45,46]).

IMMUNOLOGIE ET INFLAMMATION

Les processus inflammatoires et immunologiques, au cœur de la pathogénie de la stéatohépatite alcoolique, comprennent notamment:

- (1) la formation de complexes entre l'acétaldéhyde ou les radicaux hydroxyéthyl et certaines protéines (formation "d'**adducts**"),
- (2) les **endotoxines** bactériennes,
- (3) une réponse immune de type **cellulaire**,
- (4) la production d'**eicosanoïdes**,
- (5) et de **cytokines**.

Formation "d'adducts"

La modification de protéines par des liaisons covalentes avec l'acétaldéhyde, à savoir la formation "d'acetaldehyde adducts", les rend antigéniques et permet le développement d'anticorps circulants. Ceux-ci reconnaissent des épitopes dérivés de l'acétaldéhyde, indépendamment de la protéine qui lui est liée. Ces immunoglobulines interagissent notamment avec la membrane plasmique d'hépatocytes isolés à partir de lapins exposés à l'alcool et peuvent déclencher une cytotoxicité, après ajout de lymphocytes. Cependant, les anticorps anti-acétaldéhyde ne sont pas spécifiques des lésions induites par l'alcool, puisqu'ils se retrouvent également dans le sérum de patients présentant des pathologies hépatiques d'une autre étiologie.

Les radicaux hydroxyéthyl forment aussi des complexes (adducts) avec le CYP2E1, au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes. Les anticorps anti-radicaux hydroxyéthyl sériques (de type IgG et IgA) de patients présentant des pathologies hépatiques liées à l'alcool reconnaissent ces adducts et induisent une cytotoxicité de type humoral, liée aux cellules mononucléées circulantes. Les taux d'IgG sériques reconnaissant l'albumine humaine modifiée par des radicaux hydroxyéthyl sont élevés chez des patients présentant une pathologie hépatique liée à l'alcool et parmi de gros consommateurs d'alcool sans lésion hépatique. Leur taux est significativement moindre dans une population contrôle ou présentant une pathologie hépatique sans lien avec l'alcool [23,48].

L'induction d'un dysfonctionnement des protéines ainsi liées pourrait représenter un autre mécanisme pathogénique [16]. Par ailleurs, les adducts pourraient promouvoir la synthèse de collagène [24].

Endotoxines et cellules de Kupffer

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) associés à la membrane externe de nombreuses bactéries Gram négatif, dont le rôle dans la pathogénie des lésions hépatiques induites par l'alcool semble vérifié par plusieurs études. Une diminution de la croissance bactérienne par des lactobacilles ou une destruction des bactéries par des antibiotiques réduit les valeurs d'endotoxines et l'intensité des lésions hépatiques.

En accroissant la perméabilité intestinale aux endotoxines, l'alcool augmente leur concentration dans la veine porte. De plus, il induit l'expression des récepteurs aux LPS (CD14) à la surface des cellules de Kupffer [49]. Leur activation n'est pas sans conséquences, puisque ces macrophages libèrent alors:

- (1) des dérivés réactifs de l'oxygène (**ROS**),
- (2) des **interleukines** (IL-1 et IL-6), qui participent à la réponse inflammatoire ("acute phase response"),
- (3) des **eicosanoïdes**, impliqués dans l'augmentation de la consommation en oxygène durant les phases du métabolisme de l'alcool,
- (4) du **TNF- α** (*cf. ci-dessous*),
- (5) des **chimiokines**, stimulant la migration de lymphocytes dans le foie,
- (6) du **PDGF** (platelet-derived growth factor), stimulant majeur de la prolifération des cellules de Ito, ou cellules étoilées du foie, qui synthétisent du collagène dans l'interstice hépatique [19].

Le nombre total de cellules de Kupffer augmente lors de stéatohépatite alcoolique [50]. Les cellules de Kupffer sont des macrophages tissulaires spécifiques du parenchyme hépatique. Sous l'influence de divers stimuli, les monocytes circulants migrent dans le foie où ils se différencient en macrophages, soit en cellules de Kupffer, et deviennent une population cellulaire hépatique résidente. Ces cellules expriment alors des peroxydases endogènes et des marqueurs de surface caractéristiques des macrophages tissulaires. Grâce aux mécanismes d'apoptose notamment, leur nombre demeure relativement stable. Ces cellules sont distribuées préférentiellement dans la lumière des sinusoides et sont deux fois plus abondantes dans les régions périportales que dans les zones péricentrolobulaires, où elles sont également plus volumineuses, ce qui témoigne de leur rôle primordial comme cellules phagocytaires. Les cellules de Kupffer sont en effet capables d'éliminer de la circulation portale une variété d'éléments ou particules, tels que des composants bactériens, des endotoxines, des composants du complément ou des complexes immuns. Par ailleurs, les cellules de Kupffer interviennent dans la formation de granulomes intrahépatiques et sont également impliquées dans la différenciation des cellules dendritiques [51].

L'adaptation du modèle animal de Tsukamoto-French à la technologie "knock-out" permet de créer des souches animales présentant des altérations spécifiques de l'ADN, en l'occurrence la délétion d'enzymes clés ou de récepteurs membranaires. Il n'est cependant pas exclu que des loci autres que le locus volontairement modifié soient également altérés et participent aux résultats obtenus. Des souris knock-out ont été développées afin de préciser le rôle des cellules de Kupffer dans la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La NADPH oxydase étant l'enzyme majeure de ce processus dans les macrophages, des souris déficientes en cette enzyme ont été exposées en continu à l'alcool. Alors que des souris wild-type exposées à l'alcool présentent des valeurs d'ALAT augmentées d'un facteur 3 par rapport aux contrôles, des lésions hépatiques sévères (sous la forme d'une stéatose, d'infiltrats inflammatoires et de nécrose) et des adducts de radicaux libres dans la bile, les souris knock-out ne révélaient pas d'augmentation des ALAT. De plus, la formation de lésions hépatiques ou d'adducts était quasi totalement prévenue.

Des souris déficientes en CYP2E1 ne montrant aucune différence par rapport aux souris wild-type, tant dans la formation d'adducts que dans l'importance des lésions hépatiques, les auteurs concluent que la NADPH oxydase des cellules de Kupffer est la source majeure de radicaux libres dans la pathologie hépatique induite par l'alcool [49,52].

Immunité cellulaire

Des études *in vitro* suggèrent une activité cytotoxique de certaines populations lymphocytaires à l'encontre d'hépatocytes autologues. Un rôle putatif est accordé aux lymphocytes dans la perpétuation des lésions hépatiques liées à l'alcool (ALD), dans les phases suivant l'inflammation aiguë de la stéatohépatite alcoolique, à forte composante neutrophilique. Des arguments en faveur de cette hypothèse sont la persistance d'infiltrats lymphocytaires (CD4+ et CD8+) dans les dernières séquences actives de la stéatohépatite alcoolique et la présence de ces cellules à l'interface entre nécrose et fibrose. De plus, l'éthanol augmente l'expression de MHC de classe I (HLA-ABC) à la surface des hépatocytes; ces molécules antigéniques sont une condition préalable à une reconnaissance par des lymphocytes T cytotoxiques. Les foyers de nécrose d'interface, au contact de la lame bordante, sont également corrélés à l'expression de certaines molécules de classe II (HLA-DR et HLA-DP) [40].

Production d'eicosanoïdes

La peroxydation des lipides et les endotoxines induisent la cyclooxygénase-2 (Cox-2), dans les cellules de Kupffer. Des souris knock-out déficientes en Cox-2 sont ainsi moins sensibles aux effets des endotoxines sur le foie. Une alimentation riche en acides gras saturés, en association avec l'éthanol, diminue la peroxydation des lipides, l'activité de la CYP2E1 et la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires et vasoconstrictrices par la Cox-2. Chez le rat, l'arrêt de l'alcool seul ne permet pas d'obtenir des taux de Cox-2 mRNA similaires aux valeurs initiales (avant exposition à l'éthanol). Un retour au taux basal est observé par contre si un régime enrichi en acides gras saturés est combiné à l'arrêt de l'exposition à l'alcool [53].

Cytokines et TNF- α

Les cytokines regroupent de nombreuses protéines, produites de façon transitoire après activation cellulaire, et dont le rôle consiste en une régulation de type humoral, modulant les fonctions de cellules cibles. En fonction des circonstances, une même cytokine pourra induire des réactions totalement opposées, ce qui constitue un aspect important de leur mode de fonctionnement. Comme évoqué précédemment, les cellules de Kupffer libèrent des interleukines (IL-1 et IL-6) en réponse à divers stimuli. L'IL-6 promeut l'infiltration, la prolifération et l'activation des cellules inflammatoires [54]. L'IL-1 β aurait un rôle protecteur et pourrait s'opposer à l'hépatotoxicité du TNF- α [55].

Une cytokine d'importance majeure dans la pathogénie des lésions hépatiques en lien avec l'alcool, et en particulier de la stéatohépatite alcoolique, est en effet le TNF- α , cible de l'essai thérapeutique rapporté dans ce travail; il est décrit dans le paragraphe suivant.

Le groupe des cytokines inclut également les chimiokines, impliquées dans le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires et immunocompétentes dans des sites de lésions cellulaires. Lors de pathologies hépatiques liées à l'alcool, les taux sériques d'IL-8 (interleukine-8) sont augmentés et, chez le rat, des monocytes/macrophages exposés aux LPS produisent des MIP₁ et MIP₂ (macrophage inflammatory proteins). Ces protéines ont des propriétés chimiotactiques sur les PMN et la MIP₂ stimule la libération de superoxydes et la dégranulation des monocytes/macrophages. La MIP₂ pourrait également être impliquée dans des mécanismes d'hépatotoxicité, via une stimulation de la synthèse de protéines directement cytotoxiques [56]. Des monocytes isolés à partir de patients souffrant de stéatohépatite alcoolique présentent une production constitutive de MCP-1 (monocyte chemotactic peptide-1) Cette production est accrue après exposition à des endotoxines (LPS) et diminuée lors d'abstinence, s'associant à une amélioration clinique et des paramètres biologiques. Une diminution de l'élimination des radicaux libres pourrait être impliquée dans cette augmentation de production, dans la mesure où elle se normalise après administration de N-acétylcystéine, facteur augmentant la glutathione [57].

TNF- α

De nombreuses études indiquent que cette cytokine est produite en majorité par les macrophages, sa synthèse étant régulée par des facteurs de transcription, tel que le NF- κ B (nuclear factor- κ B) [58]. Cependant, une origine différente a également été proposée dans des modèles animaux, avec une synthèse de TNF- α intervenant dans les canalicules biliaires et les veines, tant au niveau dans les espaces porte que dans les régions centrolobulaires [59].

Le TNF- α , ou cachectine, interagit avec deux récepteurs transmembranaires, les TNF-R1 et TNF-R2 (TNF receptors-1 et 2). Des réponses cellulaires maximales sont obtenues dès que 10% des récepteurs membranaires sont occupés. Par ailleurs, des formes solubles de ces deux récepteurs, les TNF-binding proteins (TNF-BPs), sont produites par protéolyse du domaine extracellulaire. En stabilisant la structure dimérique du TNF circulant, ces protéines permettraient la libération lente de TNF bioactif et la prévention des effets toxiques de l'hypercytokinémie. Sur le plan systémique, le TNF- α est impliqué dans de nombreux phénomènes physiopathologiques; les premières études sur ses effets systémiques concernent la description d'un syndrome de choc et de lésions tissulaires en tout point comparable à un choc septique [4,60].

Le TNF- α produit différents effets majeurs sur le foie, à travers ses rôles:

- (1) d'inducteur de l'**apoptose** (*cf. chapitre précédent*),
- (2) dans la **régénération** hépatique,
- (3) d'inducteur de la transcription de gènes pro-inflammatoires, notamment de **chimiokines** et de **molécules d'adhésion**,
- (4) **cytotoxique** direct sur les hépatocytes.

La régénération hépatique après hépatectomie partielle requiert la présence de TNF- α et d'IL-6. En effet, chez le rat, la synthèse de DNA par l'hépatocyte après hépatectomie partielle est bloquée par l'administration préalable d'anti-TNF- α et une opération chirurgicale similaire chez des souris knock-out déficientes en IL-6 résulte en une nécrose et une insuffisance hépatocellulaires.

Le TNF- α provoque la sécrétion d'IL-6 par sa liaison aux récepteurs TNF-R1 des cellules de Kupffer [4]. Il induit, de même que l'IL-1, l'expression de molécules d'adhésion, telles que l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Ces molécules, présentes notamment à la surface de cellules endothéliales (dont celles bordant les sinusoides hépatiques), de cellules épithéliales et de fibroblastes, recrutent des cellules mononucléées dans les sites d'inflammation. Ces monocytes libèrent des oxydants et des protéases [58]. Lors de stéatohépatite alcoolique, l'ICAM-1 est plus fortement exprimée à la surface des hépatocytes présents dans les zones de lésions inflammatoires et les monocytes infiltrant le foie expriment le LFA-1 (leukocyte function associated antigen-1 ou CD18), récepteur reconnu par l'ICAM-1, plus intensément lors de consommation chronique d'alcool [56,61]. L'administration d'un anticorps anti-LFA-1 à des rats exposés à l'alcool a permis une diminution de l'ordre de 50% de l'activité des transaminases sériques [56].

De plus, le TNF- α induit l'expression de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) sur les cellules sinusoidales, endothéliales et les cellules de Kupffer; cette molécule est impliquée dans la phase initiale de la transmigration des neutrophiles, qui s'effectue en trois étapes:

- (1) séquestration des neutrophiles dans le réseau vasculaire hépatique,
- (2) migration transendothéliale,
- (3) hépatotoxicité dépendant de phénomènes d'adhésion, avec induction des phénomènes d'apoptose [4].

Des études sur des souris knock-out déficientes en TNF-R1 permettent de préciser le rôle du TNF- α dans la pathogenèse des lésions hépatiques induites par l'alcool. Chez ces souris, une exposition continue à l'alcool induit des lésions hépatiques minimales. En effet, chez des souris wild-type exposées à l'alcool, tant les taux sériques d'ALAT que le score pathologique, regroupant la stéatose, l'inflammation et la nécrose, sont nettement plus élevés [62].

TRAITEMENTS DE LA STÉATOHÉPATITE ALCOOLIQUE

Différentes lignes thérapeutiques ont été proposées, afin d'agir sur cette entité associée à un fort taux de mortalité, qui tend vers 50% lors de stéatohépatite alcoolique sévère non traitée [2,3]. Certaines d'entre elles sont évoquées dans ce chapitre.

Abstinence

Le soutien thérapeutique demeure essentiel, l'abstinence étant un élément-clé du traitement et de la prévention. Ce soutien thérapeutique s'appuie notamment sur le suivi médicopsychologique, le traitement des co-morbidités, dont les infections, et la correction des déficits nutritionnels et en particulier vitaminiques. Les traitements classiques de désaccoutumance à l'alcool comprennent l'Antabus[®] (disulfiram), qui bloque sélectivement l'acétaldéhyde déshydrogénase dans le foie, ou le Campral[®] (acamprosate), antagoniste du glutamate et stimulant de la transmission inhibitrice GABAergique.

Nutrition et anti-oxydants

Un apport nutritionnel adéquat est recommandé, bien qu'aucun lien direct avec une amélioration nette de la survie ne soit prouvé. Pour contrer les effets des radicaux libres et leur importance dans le genèse des lésions hépatiques, une supplémentation en anti-oxydants peut s'avérer utile [16].

A titre d'exemple, une administration de S-adenosylméthionine (SAME) permet de corriger le déficit en synthèse endogène et son administration semble bénéfique surtout dans les stades initiaux des pathologies hépatiques liées à l'alcool. La SAME est une source de cystéine, qui se dégrade elle-même de la glutathione. Ainsi, une diminution de SAME s'accompagne d'une réduction de glutathione. L'altération de l'activité de la méthyltransferase qui s'ensuit induit une modification de la fluidité membranaire, avec troubles consécutifs du transport métabolique et de la transmission des signaux cellulaires.

Des essais cliniques ont montré un effet bénéfique sur la bilirubinostase intrahépatique et une augmentation significative de la glutathione hépatique. De plus, l'administration de SAME permettrait d'améliorer la survie ou de surseoir à la transplantation hépatique, lors de cirrhose alcoolique [55].

De même, la polyenylphosphatidylcholine (PPC) est un extrait poly-unsaturé de lécithine de soja, dont l'administration à des babouins a permis une excellente prévention contre la fibrose septale et la cirrhose induites par l'alcool, ainsi qu'une protection contre le stress oxydatif. Une diminution de la transformation des cellules de Ito en cellules de type myofibroblaste a été observée in vitro, de même qu'une normalisation de l'activité de la cytochrome C oxydase, laquelle nécessite un milieu phospholipidique normal [55].

Cytokines et thérapie anti-inflammatoire

L'administration de corticostéroïdes dans la stéatohépatite alcoolique a notamment pour objectif de limiter l'inflammation, et en particulier l'infiltration neutrophilique.

Un bénéfice en termes de survie a été démontré lors d'une étude randomisée portant sur 120 patients avec stéatohépatite alcoolique sévère, présentant soit un score de Maddrey > 32 soit une encéphalopathie hépatique, lors d'un essai thérapeutique d'un mois avec 40 mg par jour de prednisolone [63]. De plus, la leucocytose et l'infiltration de PMN mise en évidence lors des ponction-biopsies hépatiques réalisent des facteurs pronostiques utiles dans la détermination des groupes de patients mieux à même de bénéficier de corticostéroïdes. Les effets bénéfiques seraient perdus après 2 ans environ, mais cet intervalle pourrait permettre notamment la programmation d'une éventuelle transplantation hépatique.

L'hypothèse d'action de la prednisolone est celle d'un accroissement initial de la stabilité des membranes lysosomiales des PMN et d'une augmentation de la synthèse d'enzymes protéolytiques. Ceci pourrait alors mener à une accélération de l'élimination d'hépatocytes nécrotiques et diminuer la production de facteurs chimiotactiques pour les PMN. Puis, la prednisolone diminuerait la production de cytokines délétères pour les hépatocytes et inhiberait l'adhésion des PMN aux cellules endothéliales [63].

Dans la stéatohépatite alcoolique sévère non traitée, les taux sériques de TNF α peuvent rester élevés durant 6 mois. Dans une étude prospective publiée en 2001, les équipes genevoises de Gastroentérologie et Hépatologie, de Pathologie clinique et du Laboratoire de l'unité des Soins intensifs ont montré une diminution significative des taux circulants de TNF α , dès le 8^{ème} jour de traitement par prednisolone [64]. Les principaux effets de cette molécule sur le foie sont les suivants:

- (1) rôle d'inducteur de l'**apoptose**,
- (2) implication dans la **régénération** hépatique,
- (3) rôle d'inducteur de la transcription de gènes pro-inflammatoires, notamment de **chémokines** et de **molécules d'adhésion**,
- (4) effet **cytotoxique** direct sur les hépatocytes.

L'administration d'anti-TNF α lors de stéatohépatite alcoolique pourrait être bénéfique, notamment en diminuant les effets d'apoptose et de cytolysse hépatocytaires et en participant à une réduction de l'inflammation. De plus, le pronostic des patients lors de leur admission hospitalière est influencé par des taux circulants élevés en TNF α et en cytokines pro-inflammatoires induites par le TNF α .

Une étude menée sur des rats a montré que les anticorps anti-TNF α diminuaient l'inflammation et la nécrose dans les lésions hépatiques précoces induites par une exposition à long terme à l'éthanol et que l'élévation du taux sérique d'ASAT était également prévenu. Toutefois, la stéatose n'était pas affectée par ce traitement, dans cette étude [65].

Les traitements par anti-TNF α sont admis en Suisse dans deux maladies systémiques inflammatoires, la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn, tant active et résistante aux corticostéroïdes et aux immunosuppresseurs oraux, que dans la forme fistulisante. L'amélioration est alors à la fois clinique et histologique.

L'infliximab (Remicade®), anticorps chimérique, est formé d'une partie Fab murine anti-TNF α et d'une portion Fc de l'IgG1 humaine. Administré par voie intraveineuse, il se lie aux molécules de TNF α avec une très haute affinité et neutralise par ce biais ses effets. Cependant, les effets secondaires sont importants, avec un risque de réactions secondaires à l'administration du produit de 6 à 25%, lesquelles peuvent être létales, et un risque accru de développement d'infections sérieuses, dont des cas d'infections opportunistes [64].

BUT DE L'ÉTUDE

L'intérêt de l'étude prospective développée dans ce travail est de déterminer de l'opportunité d'instaurer un traitement d'anti-TNF α lors de stéatohépatite alcoolique sévère, ceci en combinaison avec les corticostéroïdes, traitement de référence dans cette pathologie.

Cependant, l'effet bénéfique de la prednisolone est tardif, ce qui pourrait contribuer à la mortalité résiduelle élevée chez des patients souffrant de stéatohépatite alcoolique traités par de la Prednisonne sur une durée de 28 jours. Cette mortalité reste en effet de l'ordre de 25%. De plus, les effets retardés de la prednisolone sont particulièrement ressentis sur les taux sériques de TNF α et d'interleukine-8 (IL-8).

Comme cité précédemment, l'administration d'anticorps anti-TNF α à un modèle animal a permis une atténuation de l'inflammation et de la nécrose hépatiques. Toutefois, aucune description d'effets potentiels sur les mécanismes physiologiques de réparation et de régénération n'a été proposée.

Ainsi, le but de ce travail était de déterminer l'éventuel bénéfice de l'association d'anti-TNF α au traitement classique de prednisolone, en fonction de l'évaluation de la réponse clinique et histologique à cette combinaison et de l'estimation de la tolérance des patients à cette forme de traitement. Pour ce faire, une étude randomisée en double aveugle a donc été débutée, répartissant 20 patients en deux groupes distincts, recevant un traitement de prednisolone associé soit à l'infliximab, soit à un placebo.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

FAISABILITÉ DE L'ÉTUDE

Les objectifs de l'étude ont été présentés devant la Commission d'éthique des Hôpitaux Universitaires de Genève, laquelle a approuvé les modalités de l'étude. Celle-ci a été conduite en accord avec les principes de la Déclaration d'Helsinki.

DÉFINITION DE LA COHORTE

Un collectif de 20 patients est pris en compte dans ce travail; une sélection initiale, pratiquée par le Docteur L. Spahr, de la Division de Gastroentérologie et d'Hépatologie, a été établie sur la base des 4 critères suivants :

- (1) importante consommation récente d'alcool (> 80-120 mg/jour),
- (2) perturbation des tests hépatiques évoquant une stéatohépatite alcoolique,
- (3) score de Maddrey > 32 et ≤ 50,
- (4) obtention du consentement libre et éclairé.

La confirmation du diagnostic de stéatohépatite alcoolique chez ces 20 patients a été apportée par analyse histologique, au sein du Service de Pathologie clinique, d'une biopsie hépatique transjugulaire pratiquée par la Division de Gastroentérologie et d'Hépatologie.

Le **score de Maddrey** (discriminant function) est calculé selon la formule suivante [2]:

$$4.6 \times (\text{temps de prothrombine} - \text{temps contrôle}) + \text{bilirubine sérique totale} / 17$$

temps de prothrombine et temps contrôle [secondes]

bilirubine sérique totale [$\mu\text{mol/l}$]

L'établissement de ce score permet donc d'évaluer la sévérité de l'atteinte hépatique, sur le plan clinique. Les patients présentant un score de Maddrey supérieur à 50 ont été exclus de l'étude, en raison du risque potentiel d'effets secondaires importants liés au traitement d'infliximab lors d'insuffisance hépatique sévère.

Ces 20 patients présentent également une cirrhose et n'ont reçu aucun traitement de corticostéroïdes ou d'immunosuppresseurs durant les 6 mois ayant précédé l'étude.

L'absence de différentes comorbidités est vérifiée:

- (1) séronégativité pour l'hépatite B, l'hépatite C et le HIV,
- (2) pas d'antécédent de carcinome hépatocellulaire,
- (3) absence d'encéphalopathie hépatique, sur le plan clinique,
- (4) pas d'hémorragie gastrointestinale durant les deux semaines précédant la biopsie initiale,
- (5) absence de foyer infectieux extrahépatique,
- (6) pas d'insuffisance rénale (créatinine sérique <150 $\mu\text{mol/l}$).

En effet, une infection bactérienne concomitante non contrôlée ou une réplication virale B active, par exemple, seraient des contre-indications à un traitement immunosuppresseur (corticoïdes) et la présence d'une encéphalopathie hépatique sévère augmenterait le risque inhérent à la biopsie hépatique transjugulaire. La prednisolone est contre-indiquée lors d'ulcère gastroduodéal, dont elle masque les symptômes; par ailleurs, un rôle favorisant de cette substance dans l'apparition d'ulcères peptiques est débattu. Le carcinome hépatocellulaire se développe notamment à la faveur d'une perte de la sensibilité cellulaire aux signaux pro-apoptotiques et un traitement d'anti-TNF α pourrait aggraver ce phénomène; de plus, les altérations morphologiques et immunologiques des cellules carcinomateuses introduiraient des biais dans les résultats. Une élimination rénale quasi exclusive de la prednisolone explique qu'une insuffisance rénale constitue un critère d'exclusion.

L'absence de péritonite bactérienne spontanée est également vérifiée lors d'ascite par un comptage des neutrophiles dans le liquide de ponction, qui doivent être <250/mm³; 400 mg quotidiens de norfloxacine p.o. sont prescrits si le taux de protéines dans le prélèvement d'ascite est <10 g/l. Des compléments vitaminiques (complexe de vitamines B, acide folique, vitamine K) sont administrés le cas échéant et un apport nutritionnel adéquat (1800-2000 kcal/jour) est assuré par l'adjonction d'un complément protéique au régime pauvre en sodium classique.

D'avril 2000 à mai 2001, 41 patients présentant une symptomatologie clinique de stéatohépatite alcoolique sévère ont été pris en charge de façon consécutive par la Division de Gastroentérologie et d'Hépatologie. Sur cet ensemble de patients, 21 ont été récusés, pour les raisons suivantes :

- (1) co-infection par le HCV (5 patients),
- (2) score de Maddrey > 50 (5 patients),
- (3) étude provisoirement suspendue (3 patients n'ont pas pu être inclus),
- (4) traitement stéroïdien déjà introduit (1 patient),
- (5) départ prématuré du milieu hospitalier (1 patient),
- (6) absence de confirmation histologique de stéatohépatite alcoolique (5 patients).

Les 20 patients finalement pris en compte dans cette étude sont séparés de façon randomisée en deux groupes distincts, recevant deux formes différentes de traitement :

Groupe A : 40 mg/j de Prednisone po pendant 28 jours
 5 mg/kg d'infliximab iv à J0, en dose unique

Groupe B : 40 mg/j de Prednisone p.o. pendant 28 jours
 placebo iv à J0, en dose unique

Ces deux groupes comprennent respectivement 11 et 9 patients.

BIOPSIE HÉPATIQUE

Une biopsie hépatique transveineuse est effectuée par le Docteur L. Spahr, de la Division de Gastroentérologie et d'Hépatologie, dans les trois jours suivant l'admission de chaque patient, avant l'instauration de l'une ou l'autre forme de traitement. Celle-ci est pratiquée à l'aide d'un set TJL-101-ET (Cook Europe, Bjaeverskov, DK). Une seconde biopsie est effectuée après 10 jours (+/- 2 jours).

ANALYSE DES BIOPSIES

Microscopie optique

Les cylindres hépatiques sont fixés dans du formol tamponné à 4% et déshydratés, avant d'être enrobés en paraffine. Des tranches d'une épaisseur individuelle de 3 microns sont alors effectuées, qui sont montées sur lames. Ces dernières peuvent finalement être colorées.

La présence d'une cirrhose est vérifiée après coloration de trichrome de Masson et de Gomori, qui soulignent l'intensité et le degré de fibrose, ainsi que les anomalies architecturales, alors que la sévérité histologique des lésions de stéatohépatite alcoolique est estimée sur la base d'une coloration d'Hématoxyline-éosine.

Les coupes histologiques ont été lues et analysées par l'auteur de cette thèse, puis par la Docteure L. Rubbia-Brandt. Ces deux lectures successives ont été effectuées sans connaissance préalable des données cliniques des patients, ni de leur appartenance à l'un ou l'autre des deux groupes thérapeutiques.

Selon une méthodologie déjà employée [60], les différentes lésions élémentaires de stéatohépatite alcoolique dans les lobules hépatiques sont estimées de façon semi-quantitative selon leur répartition et leur intensité, sur une échelle de 0 à 3:

- 0 : absence de lésion,
- 1 : intensité discrète,
- 2 : intensité modérée,
- 3 : intensité sévère.

Un score de lésions hépatocellulaires ("hepatocellular damage score" [61]) pré- et post-traitement est établi, correspondant à l'addition du score individuel de chacun des éléments suivants :

- (1) ballonnisation hépatocellulaire,
- (2) corps de Mallory,
- (3) stéatose,
- (4) nécrose hépatocellulaire,
- (5) bilirubinostase canaliculaire.

En ce qui concerne la stéatose, l'échelle d'intensité correspond à l'évaluation biopsique habituelle de cette lésion, selon le pourcentage d'hépatocytes sièges d'une accumulation lipidique (0 = absence de stéatose, 1 = < 30% d'hépatocytes stéatosiques, 2 = 30-60% d'hépatocytes atteints, 3 = > 60% de cellules stéatosiques).

Quant à l'évaluation de la sévérité de la fibrose, un score 1 indique une fibrose portale avec ou sans ébauches de ponts fibreux, un score 2 correspond à une fibrose extensive et remaniante, de type processus cirrhogène, et un score 3 à une cirrhose constituée.

L'inflammation lobulaire est analysée par une méthode quantitative, avec séparation des neutrophiles et des éléments mononucléés, essentiellement représentés par des lymphocytes. La totalité de la biopsie est examinée à fort grossissement (400x) et les deux populations cellulaires sont comptées manuellement. Les deux valeurs obtenues sont alors divisées par le nombre de champs lobulaires comptés et considérées comme un chiffre moyen par champ à fort grossissement. Ceci est en effet rendu nécessaire par la grande variation interindividuelle dans la taille des cylindres hépatiques biopsiés et par la répartition hétérogène des cellules inflammatoires chez un patient donné.

Il est à relever que le décompte morphologique des polymorphonucléaires neutrophiles est rendu aisé par la forme caractéristique, multilobulée, du noyau de ces cellules. Les lymphocytes, petites cellules à noyau rond, sont par contre plus difficiles à décompter avec certitude. Pour cette raison, une vérification par identification immunohistochimique a été pratiquée. Les lymphocytes T, population largement majoritaire dans les atteintes de type stéatohépatite alcoolique, ont ainsi été marqués par un anticorps anti-CD3. Les décomptes après coloration standard et après immunohistochimie sont similaires.

Evaluation de l'apoptose

Le nombre de corps apoptotiques hépatocytaires a été quantifié par une révélation de type TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling), commercialisée par Roche Diagnostic AG, Rotkreuz, Suisse. Les sections tissulaires ont été déparaffinées, ré-hydratées et digérées avec 3 µg/ml de protéinase K durant 15 minutes à température ambiante. Après lavage, les sections ont été incubées dans 25 mM de chlorure de cobalt, 0.01 mM de biotine-16-dUTP et 25 U/ml de déoxynucléotidyltransférase terminale. Après avoir bloqué la peroxydase endogène par immersion dans de l'eau distillée contenant 25% d'H₂O₂ durant 3 minutes, les sections ont été lavées et incubées avec de la streptavidine conjuguée à une peroxydase, développées dans de l' H₂O₂-diaminobenzidine et contre-colorées à l'hématoxyline.

Les hépatocytes positifs sont identifiés sur la base de leur localisation anatomique, au sein des travées hépatocytaires. Les noyaux positifs ont été comptés manuellement à des champs à fort grossissement (400x) et un score apoptotique a été établi. Chaque champ à fort grossissement contenait en moyenne 250 hépatocytes et l'index apoptotique a été défini comme le nombre de cellules révélées par la méthode TUNEL par champ à fort grossissement et a été calculé en divisant le nombre total d'hépatocytes positifs par le nombre de champs à fort grossissement évaluables dans chaque biopsie.

ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en majorité en termes de distribution.

La moyenne +/- déviation standard, la médiane ou les "interquartile ranges" sont parfois également cités. Le test non paramétrique Mann-*U*-Whitney a été appliqué pour déterminer les différences de base entre les groupes. Afin d'examiner les différences entre les jours J0 et J10 dans chaque groupe de traitement, le test de Wilcoxon (wilcoxon signed rank test) a été utilisé. La limite statistique significative a été établie à < 0.05 .

RÉSULTATS

DONNÉES AVANT TRAITEMENT

Après attribution randomisée aux deux différents groupes de traitement, 11 patients ont bénéficié d'un traitement de stéroïdes en combinaison avec de l'infliximab (**Groupe A**) et 9 patients ont reçu des stéroïdes et un placebo (**Groupe B**).

Ces deux groupes sont comparables en ce qui concerne la sévérité de l'insuffisance hépatique, le gradient de pression veineuse hépatique et le score de Maddrey, ceci lors de l'évaluation initiale. Il est à relever toutefois que le **Groupe A** se compose exclusivement de patients masculins. Le *Tableau 1* résume certaines **caractéristiques et valeurs biologiques** des patients des deux groupes de traitement.

	Groupe A	Groupe B
Sexe (H/F)	11/0	4/5
Age moyen (et extrêmes)	52 (34-69)	56 (44-63)
Score de Child-Pugh	11 (9-12)	11 (9-12)
Score de Maddrey initial	40.5 (32-53)	42.3 (33-50)
HVPG (mmHg)	19.5 (\pm 1.1)	18.0 (\pm 1.0)
ASAT (UI/l)	103 (54-173)	120.2 (14-376)
Bilirubine totale (μ mol/l)	180.3 (52-469)	110.9 (27-194)
Leucocytes circulants (g/l)	9.5 (4.6-14.8)	8.9 (3.6-22.4)

Tableau 1. Caractéristiques cliniques des patients

HVPG : hepatic venous pressure gradient

Différences entre les deux groupes de traitement pour l'ensemble de critères mentionnés : statistiquement non significatives.

Dans les différents tableaux ci-après, les données individuelles des 20 patients inclus dans cette étude ont été rapportées de façon séquentielle. Le **Groupe A** comprend les patients rendus anonymes sous les N° 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 14, 17, 19 et 20, alors que le **Groupe B** rassemble les patients N° 3, 5, 7, 9, 12, 13, 15, 16 et 18.

Histologiquement, rappelons que l'intensité de chaque lésion individuelle est déterminée de façon semi-quantitative selon une échelle de 0 (absence de lésion) à 3 (lésions d'intensité sévère).

En ce qui concerne l'intensité de la **fibrose septale**, l'ensemble des biopsies examinées montre au minimum une fibrose extensive et remaniante, de type processus cirrhogène, remplissant les critères d'un score 2. Une cirrhose constituée justifie quant à elle un score 3.

L'examen histologique des biopsies effectuées avant l'introduction des deux modalités de traitement montre un degré de sévérité d'**atteinte hépatocellulaire** entre les **Groupes A et B** non significatif sur le plan statistique.

L'**index apoptotique** est similaire entre les deux groupes. La détermination des **hépatocytes en voie d'apoptose** révélés par la méthode TUNEL est illustrée par la *Figure 4*.

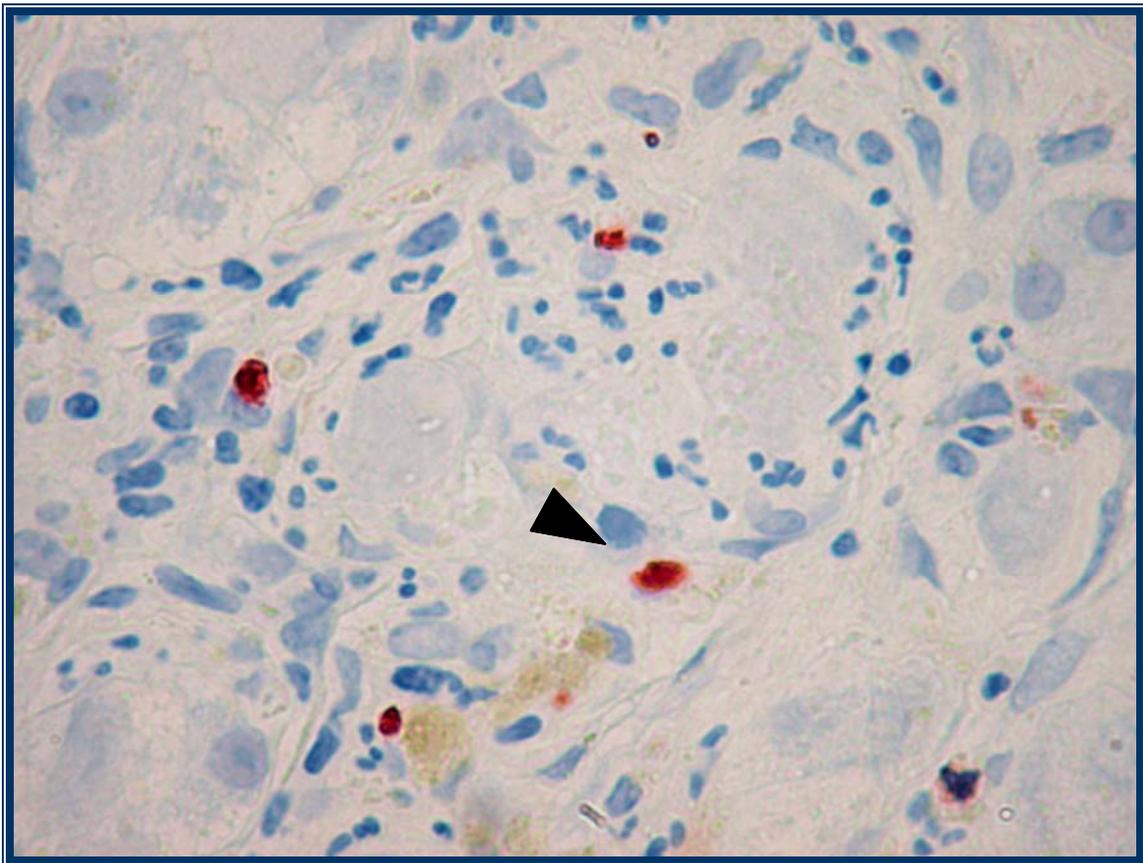


Figure 4. Marquage des corps apoptotiques (méthode TUNEL).

▲ Marquage nucléaire de l'apoptose

Ces trois différents paramètres sont illustrés dans le *Tableau 2*.

A noter que dans ce tableau et ceux qui suivront, la répartition des patients est similaire, à savoir que dans la colonne représentant le groupe A, les données des patients rendus anonymes sous les N° 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 14, 17, 19 et 20 sont représentées ligne après ligne, en respectant cet ordre chronologique, schéma reproduit pour le groupe B, rassemblant les patients N° 3, 5, 7, 9, 12, 13, 15, 16 et 18.

Fibrose septale		HepDam		TUNEL	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
3	3	7	9	1.19	0.36
3	3	8	5	3.89	0.59
3	3	11	2	1.25	0.33
3	3	8	4	0.47	0
2	3	10	6	0.23	0.07
2	3	8	4	0.05	0.33
3	3	6	4	0.14	0.6
2	3	8	8	0.13	0.09
3	2	5	10	0	0
3		6		0.3	
3		12		0	

Tableau 2. Principales caractéristiques histologiques avant traitement, par patient
HepDam : hepatocellular damage score

Rappelons que le **score de lésions hépatocellulaires** ("hepatocellular damage score") représente la somme de l'intensité des différentes lésions élémentaires de stéatohépatite alcoolique dans les lobules hépatiques, lesquelles sont réparties avant traitement selon le *Tableau 3*.

Ballonisation		Corps Mallory		Stéatose		Nécrose		Bilirubinostase	
Gr. A	Gr. B	Gr. A	Gr. B	Gr. A	Gr. B	Gr. A	Gr. B	Gr. A	Gr. B
1	2	2	2	1	3	1	1	2	1
2	1	2	2	2	1	1	1	1	0
3	1	3	1	1	0	1	0	3	0
2	1	2	1	1	1	1	0	2	1
2	1	2	1	3	3	1	0	2	1
2	1	2	1	3	2	1	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	1	2	2
1	1	1	2	3	3	1	0	2	2
1	3	1	3	3	2	0	1	0	1
1		1		1		1		2	
3		3		3		1		2	

Tableau 3. Répartition des lésions hépatocellulaires avant traitement, par patient

Un des critères histologiques recherchés, à savoir la présence de corps de Mallory, est illustré par la *Figure 5*.

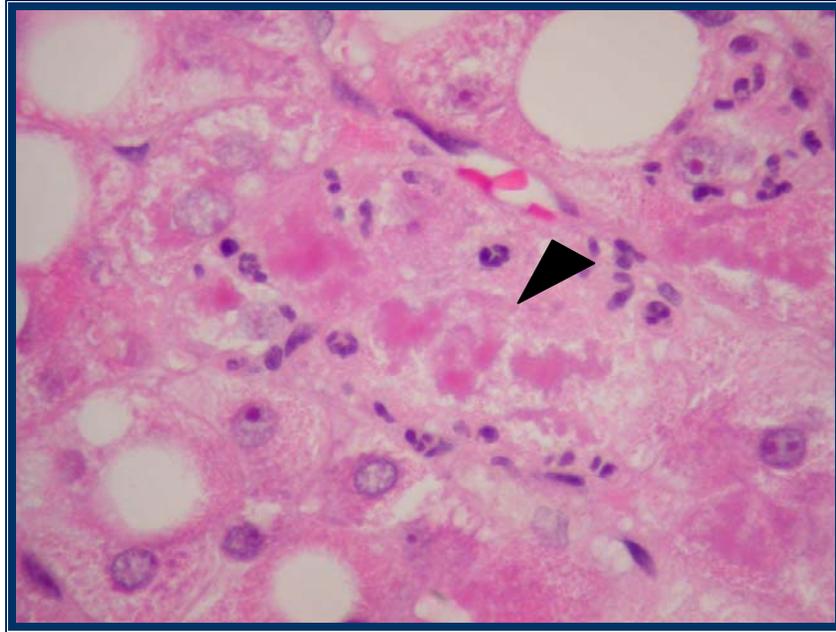


Figure 5. Corps de Mallory

L'**atteinte hépatique inflammatoire** se compose de deux populations cellulaires: les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), qui peuvent s'agencer en couronne et réaliser des images de "satellitose" (*Figure 6*), et l'infiltrat mononucléé, surtout lymphocytaire.

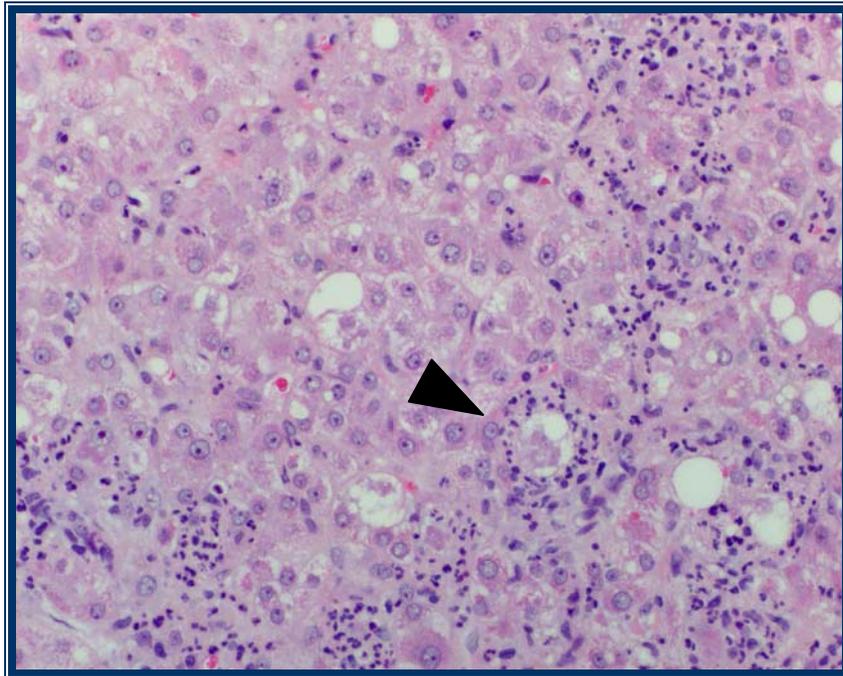


Figure 6. PMN réalisant une image de "satellitose"

La localisation de l'infiltrat est également importante dans l'évaluation diagnostique d'une biopsie. Celle-ci peut être portale ou lobulaire. L'infiltrat lobulaire, et en particulier l'infiltrat neutrophilique, est un élément clé dans la détermination de l'activité hépatitique, et donc de l'intensité histologique des lésions.

L'évaluation semi-quantitative de l'inflammation portale et lobulaire, ainsi que le décompte manuel de la population neutrophilique et lymphocytaire rapporté au nombre de champs à fort grossissement, sont résumés dans le *Tableau 4*.

Inflammation portale		Inflammation lobulaire		Neutrophiles		Lymphocytes	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
2	2	2	2	11.25	19.32	14.5	16.47
1	1	3	1	90.25	10.07	50	29.67
1	2	2	1	41.23	3.22	36.54	23
1	1	2	1	10.66	3.05	17.56	10.11
1	1	1	1	2.26	1	9.35	11.13
1	2	3	2	18.04	13.5	16.44	23.13
1	1	2	2	7.5	12.31	34.5	24.08
1	1	2	1	7.03	3.95	14.56	16.38
1	1	1	2	5.33	24.5	19.83	19.5
1		1		3.66		12.83	
2		3		32.31		22.62	

Tableau 4. Localisation et type d'inflammation, par patient

L'importance de l'atteinte inflammatoire avant introduction du traitement ne présente pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes de patients étudiés (PMN: $p = 0.4250$; lymphocytes lobulaires: $p = 0.9697$).

ÉVOLUTION APRÈS INTRODUCTION DU TRAITEMENT

Après introduction de stéroïdes chez l'ensemble des patients de la cohorte et administration d'une dose intraveineuse unique d'infliximab (**Groupe A**) ou d'un placebo (**Groupe B**), les différents paramètres biologiques et histologiques évoqués ci-dessus ont été évalués une seconde fois. Pour ce faire, une deuxième biopsie hépatique a été pratiquée à $J10 \pm 2$ jours.

Durant l'administration d'infliximab, aucune modification des paramètres vitaux faisant l'objet d'un monitoring, à savoir la fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne et la température corporelle, n'a été observée. De plus, aucun patient n'a présenté de symptomatologie particulière, de type céphalées, érythème facial ou myalgies notamment, manifestations pourtant précédemment décrites après administration intraveineuse de cette substance.

Cependant, au cours du suivi des patients, trois décès sont intervenus, dont deux dans le **Groupe A**. L'un était consécutif à une hémorragie massive après 28 jours de traitement, l'autre à une insuffisance hépatique, au 51^{ème} jour de traitement. Le dernier décès, concernant un patient du **Groupe B**, était dû à une péritonite bactérienne spontanée à 40 jours post-introduction du traitement, dans un contexte de survenue d'un abcès épidual au 7^{ème} jour.

En ce qui concerne les paramètres histologiques, le degré de **fibrose septale** est resté inchangé.

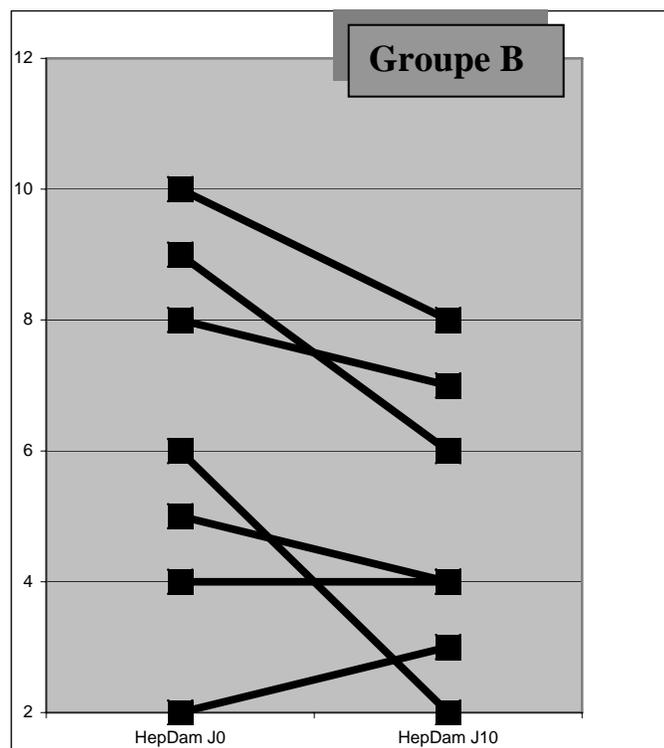
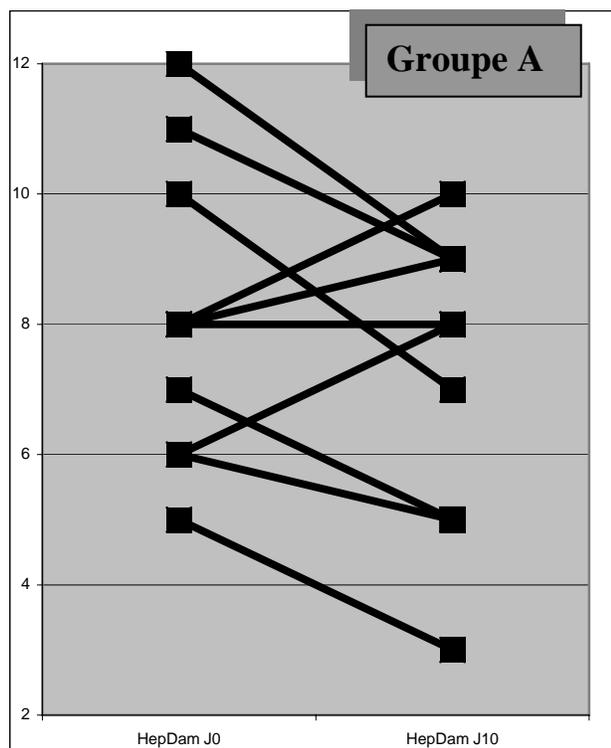
Le deuxième paramètre histologique évoqué dans le chapitre précédent est le **score de lésions hépatocellulaires** ("hepatocellular damage score"). De façon générale, une diminution de ce score a pu être observée après introduction du traitement, mais celle-ci reste néanmoins statistiquement non significative, dans les deux groupes de patients (**Groupe A**: $p = 0.2059$; **Groupe B**: $p = 0.0770$).

Le *Tableau 5* résume l'intensité des lésions hépatocellulaires avant traitement et au 10^{ème} jour après son introduction, ainsi que la différence en chiffre absolu entre les deux décomptes, pour chaque patient (*ΔHepDam*).

Le *Graphique 1* illustre la tendance à la diminution de l'intensité des lésions, relevée ci-dessus.

HepDam à J0		HepDam à J10		Δ HepDam	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
7	9	5	6	- 2	- 3
8	5	9	4	+ 1	- 1
11	2	9	3	- 2	+ 1
8	4	8	4	0	0
10	6	7	2	- 3	- 4
8	4	8	4	0	0
6	4	5	4	- 1	0
8	8	10	7	+ 2	- 1
5	10	3	8	- 2	- 2
6		8		+ 2	
12		9		- 3	

Tableau 5. Evolution du score des lésions hépatocellulaires (Δ HepDam), par patient (non significative statistiquement)
HepDam : hepatocellular damage score



Graphique 1. Evolution des lésions hépatocellulaires entre J0 et J10 (Δ HepDam), par patient

Le décompte des **hépatocytes en voie d'apoptose** après révélation par la méthode TUNEL (*Tableau 6*) montre globalement une augmentation des images apoptotiques après traitement, plus importante au sein du **Groupe A**, qui bénéficie de l'anti-TNF- α . Toutefois, aucune différence statistiquement significative n'est observée ($p > 0.05$), tant dans l'évolution au sein de chaque groupe que dans la différence de moyennes d'évolution entre les deux groupes de traitement.

TUNEL à J0		TUNEL à J10		Δ TUNEL	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
1.19	0.36	4.75	1.4	3.56	1.04
3.89	0.59	2.38	0.4	-1.51	-0.19
1.25	0.33	2.5	0.14	1.25	-0.19
0.47	0	15.6	0.25	15.13	0.25
0.23	0.07	0	1.28	-0.23	1.21
0.05	0.33	3.3	0.25	3.25	-0.08
0.14	0.6	0.5	0.65	0.36	0.05
0.13	0.09	0.38	2.14	0.25	2.05
0	0	0	0.78	0	0.78
0.3		0.47		0.17	
0		0.68		0.68	

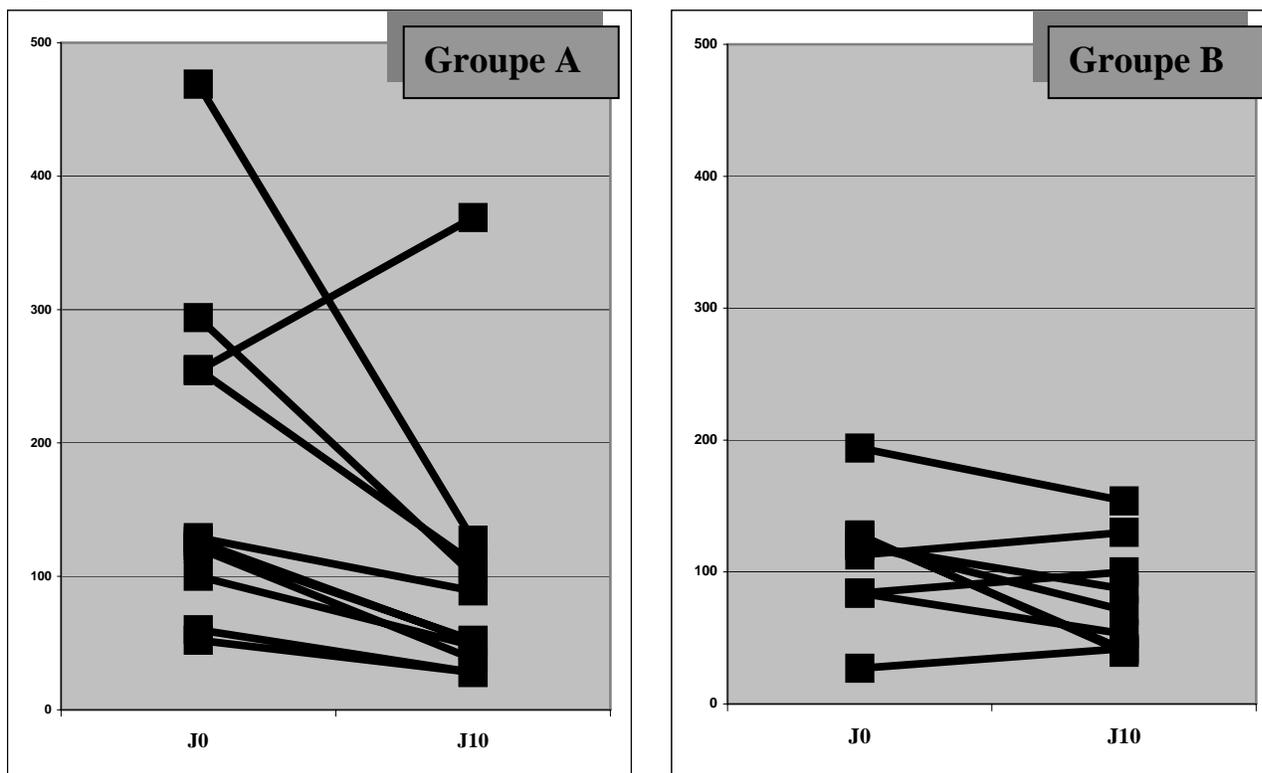
Tableau 6. Evolution du nombre de corps apoptotiques (Δ TUNEL)

Sur le plan clinique, une diminution importante et statistiquement significative ($p = 0.0262$) a été observée dans le dosage sérique de la **bilirubine**, particulièrement drastique et évidente chez 3 patients 10 jours après administration d'infliximab associé à de la Prednisone. Cette baisse était nettement moins importante, à la limite de la signification statistique ($p = 0.0506$), dans le groupe traité par Prednisone et placebo. Ces résultats sont illustrés dans le *Tableau 7* et le *Graphique 2*.

Bilirubine à J0		Bilirubine à J10		Δ Bilirubine	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
294	128	101	39	- 193	- 89
100	27	48	42	- 52	15
254	84	369	100	115	16
255	113	110	130	- 145	17
126	127	51	41	- 75	- 86
121	84	38	53	- 83	- 31
129	194	89	154	- 40	- 40
469	121	127	71	- 342	- 50
52	120	28	87	- 24	- 33
123		52		- 71	
60		28		- 32	

Tableau 7. Evolution par patient de la bilirubine sérique totale (Δ bilirubine sérique totale)

p < 0.02



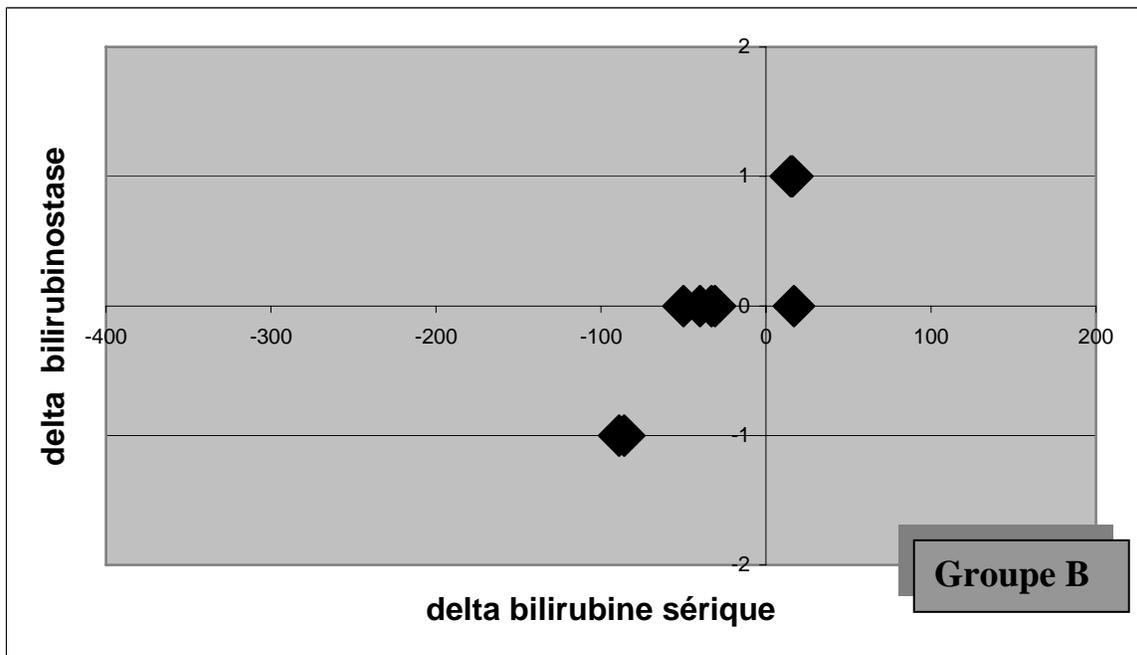
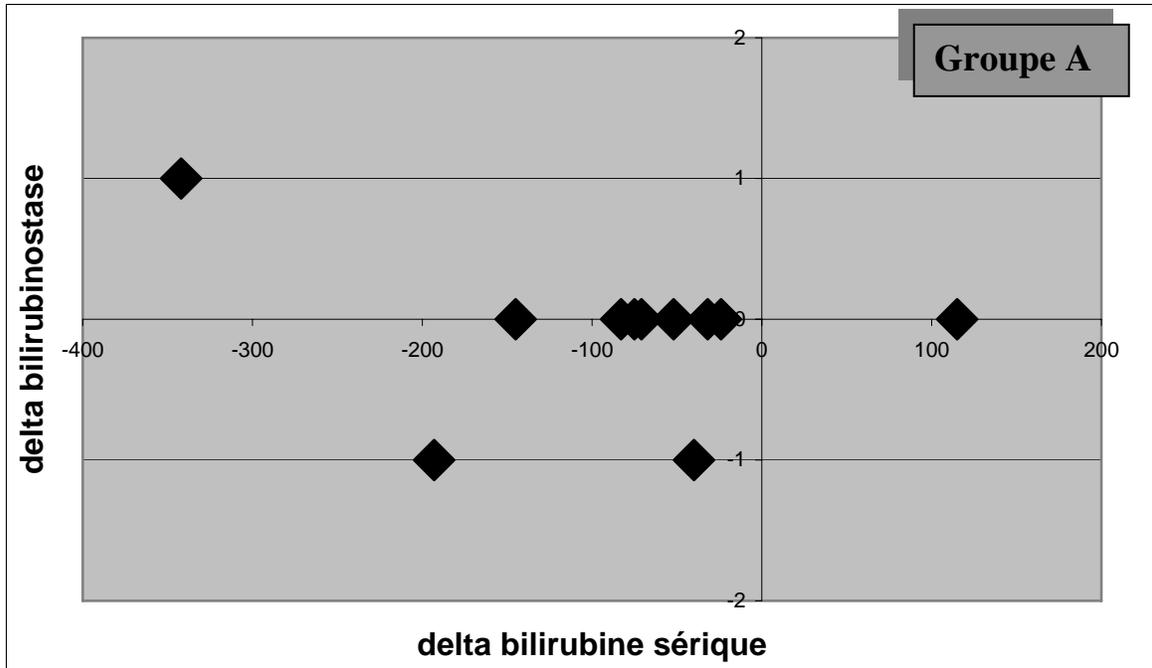
Graphique 2. Evolution par patient de la bilirubine sérique totale entre J0 et J10 (Δ bilirubine sérique totale)

En ce qui concerne l'évaluation des lésions hépatocellulaires individuelles, il était donc particulièrement intéressant de comparer ce critère clinique à l'expression histologique d'une stase biliaire, soit la **bilirubinostase canaliculaire**, dont les valeurs à J0 et J10, ainsi que l'évolution entre les deux temps d'analyse sont consignées dans le *Tableau 8*.

Bilirubinostase à J0		Bilirubinostase à J10		Δ Bilirubinostase	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
2	1	1	0	-1	-1
1	0	1	1	0	1
3	0	3	1	0	1
2	1	2	1	0	0
2	1	2	0	0	-1
0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	-1	0
2	2	3	2	1	0
0	1	0	1	0	0
2		2		0	
2		2		0	

Tableau 8. Evolution histologique de la bilirubinostase (Δ bilirubinostase)

Aucun corrélat n'a cependant pu être mis en évidence entre les taux sériques de bilirubine totale et l'intensité de la bilirubinostase observée histologiquement, ainsi que l'illustrent les *Graphiques 3*.



Graphiques 3. Différence individuelle d'évolution de la bilirubine sérique totale rapportée à la bilirubinostase canaliculaire

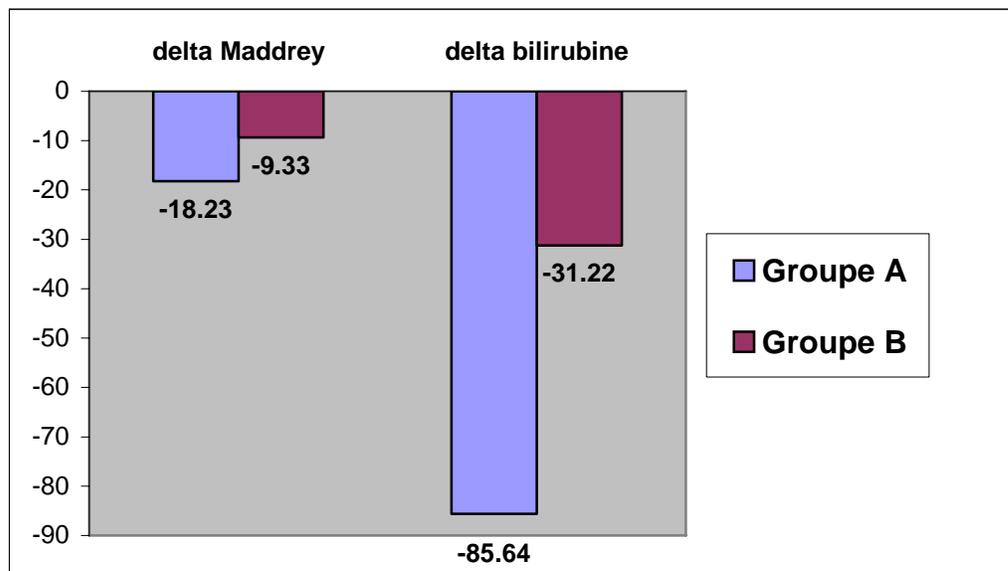
Un autre paramètre clinique d'importance est le **score de Maddrey** (Maddrey's discriminant function). Celui-ci est influencé de façon statistiquement significative dans le **Groupe A**, associant l'inflximab au traitement classique de stéroïdes, entre le premier

et le dixième jour de l'étude ($p = 0.0067$). Par contre ce score ne présente pas d'évolution significative entre J0 et J10 dans le **Groupe B**, recevant stéroïdes et placebo ($p = 0.1097$). Ces résultats sont repris dans le *Tableau 9*.

Score Maddrey à J0		Score Maddrey à J10		Δ Score Maddrey	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
53	34	21	15	-32	-19
38	44	43	36	+5	-8
36	33	34	44	-2	+11
32	50	17	57	-15	+7
50	44	8.5	17	-41.5	-27
38	33	17	27	-21	-6
48	50	43	51	-5	+1
40	50	18	21	-22	-29
32	43	16	29	-16	-14
40		16		-24	
39		12		-27	

Tableau 9. Evolution du score de Maddrey (Δ Maddrey)

Le *Graphique 4* résume la diminution significative des deux paramètres cliniques que sont le taux de bilirubinémie et le score de Maddrey, dans les deux groupes de patients.



Graphique 4. Différence d'évolution par groupe du score de Maddrey et de la bilirubine sérique totale

Enfin, l'étude de l'évolution de l'**infiltrat inflammatoire**, tant neutrophilique que lymphocytaire, n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les deux groupes de traitement, données consignées dans les *Tableaux 10 et 11*.

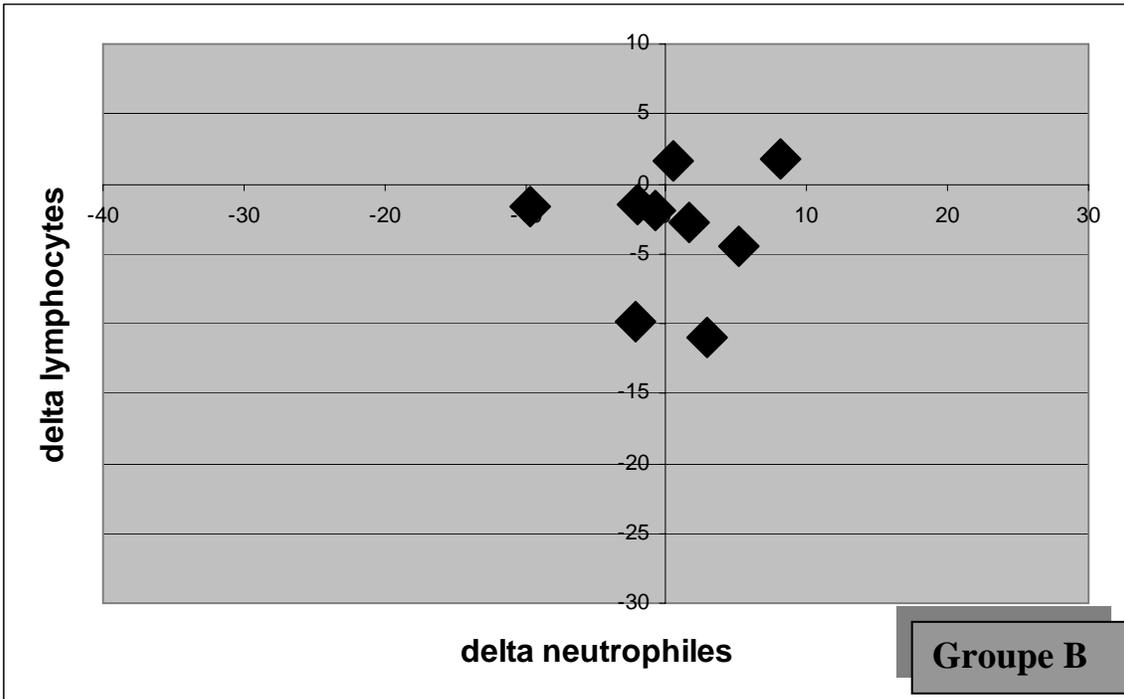
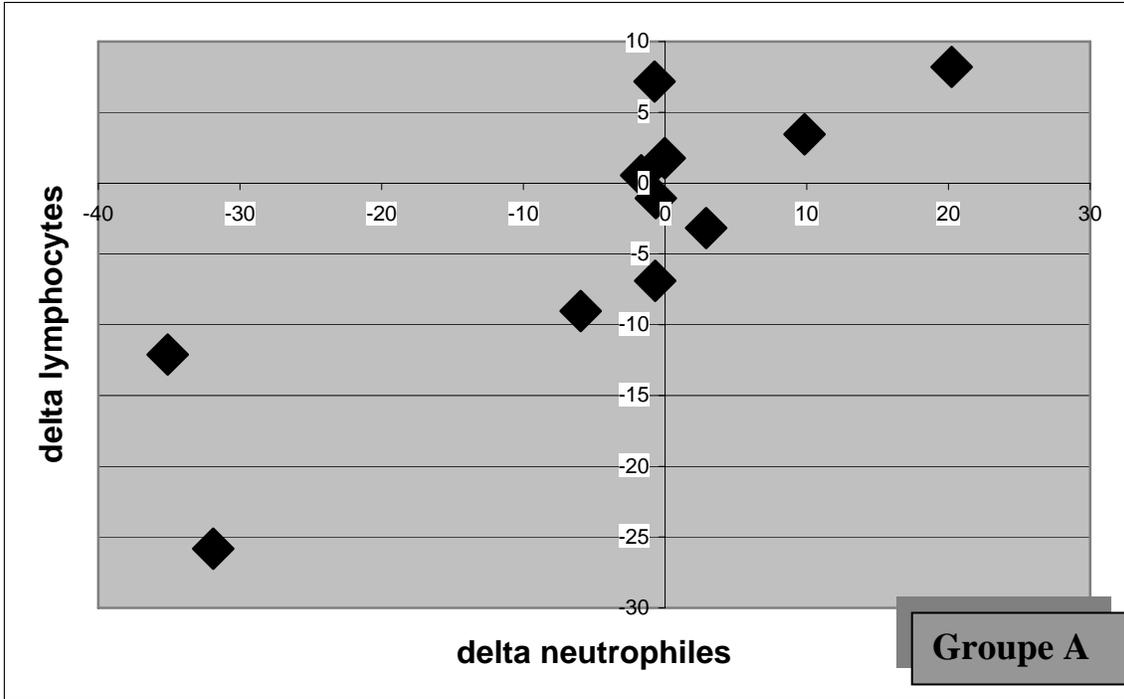
Neutrophiles à J0		Neutrophiles à J10		Δ Neutrophiles	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
11.25	19.32	10.5	9.71	-0.75	-9.61
90.25	10.07	58.36	12.92	-31.89	2.85
41.23	3.22	6.14	2.5	-35.09	-0.72
10.66	3.05	20.5	1	9.84	-2.05
2.26	1	1.61	2.6	-0.65	1.6
18.04	13.5	38.27	14	20.23	0.5
7.5	12.31	5.81	10.15	-1.69	-2.16
7.03	3.95	7	9.14	-0.03	5.19
5.33	24.5	4.64	32.59	-0.69	8.09
3.66		6.57		2.91	
32.31		26.35		-5.96	

Tableau 10. Evolution du nombre de neutrophiles (Δ neutrophiles)

Lymphocytes à J0		Lymphocytes à J10		Δ Lymphocytes	
Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B	Groupe A	Groupe B
14.5	16.47	21.67	14.86	7.17	-1.61
50	29.67	24.17	18.67	-25.83	-11
36.54	23	24.43	21.1	-12.11	-1.9
17.56	10.11	21	8.55	3.44	-1.56
9.35	11.13	8.28	8.31	-1.07	-2.82
16.44	23.13	24.64	24.78	8.2	1.65
34.5	24.08	35.04	14.25	0.54	-9.83
14.56	16.38	16.32	11.86	1.76	-4.52
19.83	19.5	12.93	21.31	-6.9	1.81
12.83		9.65		-3.18	
22.62		13.59		-9.03	

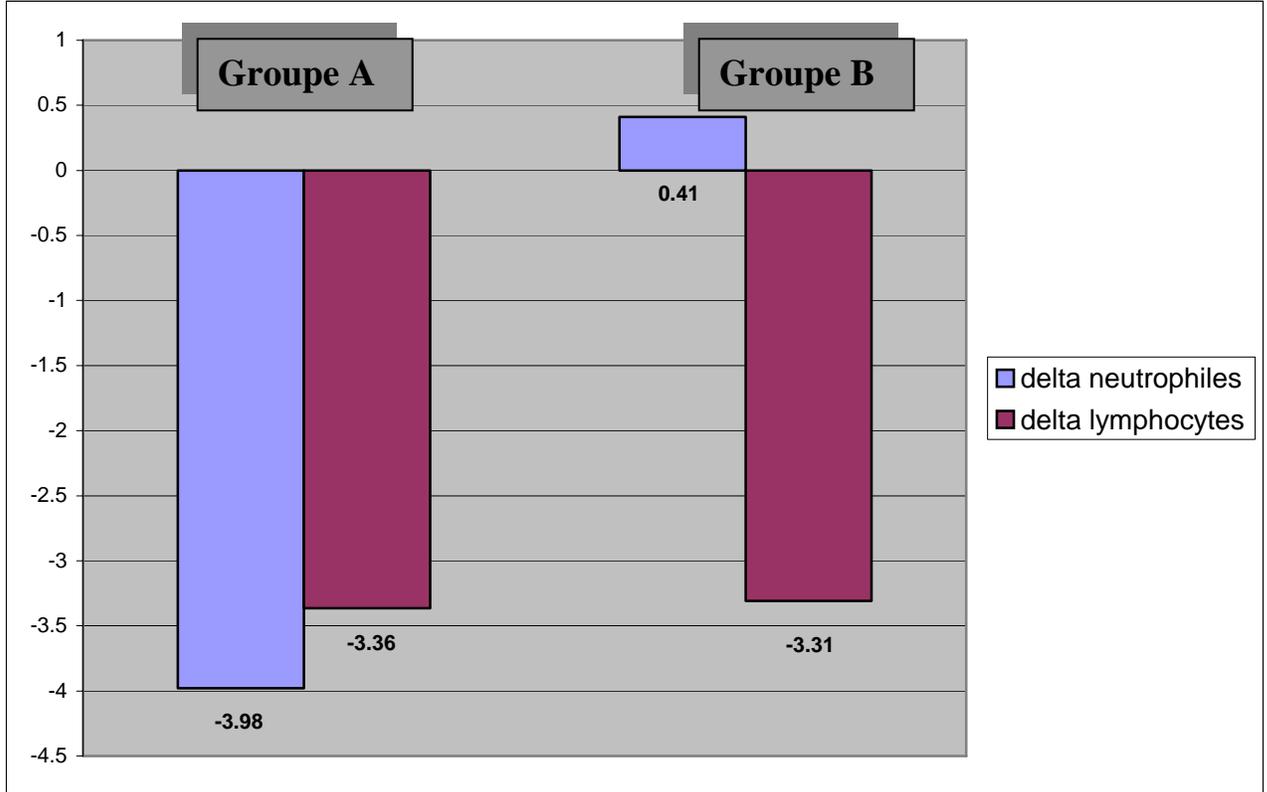
Tableau 11. Evolution du nombre de lymphocytes (Δ lymphocytes)

Toutefois, parmi les patients du **Groupe A**, traités par anti-TNF- α et Prednisone, une tendance à une évolution similaire entre les deux types d'infiltrat inflammatoire se dessine, ce que soulignent les *Graphiques 5*.



Graphiques 5. Différence d'évolution du nombre de neutrophiles par rapport à l'infiltration lymphocytaire lobulaire

Par ailleurs, la différence d'évolution de l'infiltrat neutrophilique dans le **Groupe A** indique une diminution globale de celui-ci (Δ neutrophiles = - 3.98), alors que celle du **Groupe B** montre un discret accroissement global de l'infiltrat (Δ neutrophiles = 0.41), tel qu'illustré dans le *Graphique 6*.



Graphique 6. Différence d'évolution du nombre de neutrophiles et de lymphocytes lobulaires dans les deux groupes de traitement

DISCUSSION

Evaluer la tolérance à l'infliximab des patients souffrant de stéatohépatite alcoolique sévère confirmée histologiquement et son efficacité thérapeutique lors d'une association avec de la Prednisone administrée quotidiennement, tels étaient les objectifs cliniques de cette étude. En effet, aucune étude de tolérance à l'infliximab n'avait été menée chez des patients présentant une cirrhose et une stéatohépatite alcoolique avant la conduite de l'étude décrite ci-dessus.

Or, aucun des 11 patients traités par infliximab ne présenta de réaction aiguë post-administration de la substance. Malgré le nombre restreint de patients inclus dans cette étude, ceci suggère que l'infliximab pourrait être bien toléré chez des patients présentant une insuffisance hépatique sévère.

En 2003, une étude menée postérieurement à la nôtre confirma la bonne tolérance à l'infliximab de 10 patients souffrant de stéatohépatite alcoolique. Elle montra par ailleurs une diminution du gradient de pression veineuse hépatique, une augmentation du flux sanguin hépatique, ainsi qu'une amélioration du score de Maddrey [66].

Une étude française parue en 2004 porta sur 36 patients, dont la moitié reçut 3 doses iv d'infliximab, au début du traitement, puis après 2 et 4 semaines. Le traitement comportait également 40mg/j de prednisolone, pendant 28 jours. Comme dans notre étude, le reste du collectif de patients bénéficia de prednisolone associée à un placebo. L'étude fut stoppée prématurément, les auteurs ayant conclu que la probabilité de décès à 2 mois et que le nombre d'infections sévères étaient plus élevés dans le groupe traité par infliximab. Ils ont néanmoins reconnu que le score de Maddrey était plus élevé chez les patients décédés après 2 mois et chez ceux décédés des suites d'une infection; de plus, les dosages d'infliximab étaient particulièrement élevés [67].

Ces mêmes auteurs expliquaient la vulnérabilité constatée aux infections par un trouble de la fonction des PMN. Une autre possibilité serait celle d'une action sur la survie et sur la fonction des lymphocytes T activés. En détruisant ces cellules inflammatoires, l'infliximab pourrait induire une immunosuppression [68]. L'efficacité de l'infliximab, anticorps monoclonal chimérique IgG1, a en effet été attribuée à des mécanismes d'induction de cytotoxicité, à l'activation du complément et à l'induction d'apoptose dans la population lymphocytaire T et macrophagique, médiés par la portion Fc de ces anticorps dirigés contre le TNF- α . Dans ce sens, une nouvelle molécule dénuée de la portion Fc de l'anticorps, le certolizumab pegol, fait actuellement l'objet d'études cliniques. Il sera intéressant de vérifier si cette molécule comporte réellement une toxicité inhérente plus faible.

Dans l'étude présentée dans ce travail, au sein du groupe de patients traité par infliximab, une diminution statistiquement significative du score de Maddrey a pu être observée, lequel représente un indicateur fiable de la sévérité de l'atteinte hépatique. En effet, une administration unique de 5 mg/kg d'infliximab associée à de la Prednisone en prise quotidienne a permis une diminution importante du score de Maddrey au 28^{ème} jour de

traitement. Ces résultats prometteurs, obtenus dans un contexte d'étude pilote doivent être vérifiés à plus grande échelle, sur un collectif de patients plus important.

En ce qui concerne l'évaluation des paramètres histologiques sous traitement, il est important de rappeler que, chez l'ensemble des patients, une confirmation du diagnostic de stéatohépatite alcoolique a été apportée par l'examen histologique d'une biopsie hépatique. En plus de cette vérification diagnostique, la biopsie hépatique permet d'évaluer le degré d'atteinte histologique, lequel ne présente pas une relation linéaire avec la sévérité clinique de l'insuffisance hépatique.

Premièrement, le degré de fibrose septale est resté inchangé, un résultat attendu au vu du délai extrêmement court, de 10 jours en moyenne, s'étendant entre la biopsie initiale et celle effectuée post-traitement. Il serait néanmoins intéressant de suivre l'évolution de ce paramètre à plus long terme, la fibrose pouvant régresser après diminution ou cessation des stimuli de nature inflammatoire. En effet, les cellules étoilées hépatiques (dites cellules de Ito), responsables de la fibrogenèse, sont sensibles à une variété de chimiokines et médiateurs de l'inflammation.

Il est en effet fréquent d'observer un décalage temporel entre la mise en évidence d'une réponse clinique au traitement et l'apparition d'une évolution histologique des lésions.

Au sein de notre collectif de patients, une seconde ligne d'étude a révélé une diminution significative des taux sériques d'IL-6 et d'IL-8, mais il s'agit de résultats préliminaires, qui n'ont pas été présentés dans ce travail. L'anti-TNF- α permet ainsi une diminution de médiateurs de l'inflammation influençant les cellules de Ito. Une étude incluant un plus grand nombre de patients, acceptant de se soumettre à des biopsies de contrôle à plus long terme, permettrait de déterminer si une régression de la fibrose hépatique est possible, voire même lorsqu'elle atteint le stade de cirrhose constituée.

Deuxièmement, dans le *Graphique 1*, une tendance à l'amélioration de l'ensemble des lésions hépatocellulaires ("hepatocellular damage score") semble s'ébaucher. De façon hypothétique, il se pourrait que celle-ci se voie confirmée à plus long terme et qu'un délai plus important que les 8 à 12 jours d'évolution disponibles dans cette étude soient nécessaires à une réponse histologique plus favorable et plus intense. Néanmoins, cette tendance à la diminution de l'intensité des lésions concerne les deux groupes de traitement. Il est donc difficile de dissocier ces possibles effets favorables du traitement de base aux stéroïdes, dont ont bénéficié l'ensemble des 20 patients inclus dans cette étude.

Sur le plan de l'atteinte inflammatoire, troisièmement, aucune modification statistiquement significative n'a été mise en évidence, tant dans la population de polymorphonucléaires que dans celle des lymphocytes. L'infliximab, par la diminution des processus inflammatoires dépendant du TNF- α , devrait néanmoins agir sur les chimiokines responsables de l'afflux des cellules inflammatoires, qui viennent augmenter la population hépatique résidente. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'un suivi

histologique à plus long terme permettrait une amélioration de ce critère histologique de sévérité de la stéatohépatite alcoolique.

Une étude multicentrique non randomisée publiée après notre étude, en 2003, a inclus 12 patients avec stéatohépatite alcoolique sévère, confirmée histologiquement. Comme dans la présente étude, le score de Maddrey était ≥ 32 et ces patients ont été traités par une dose unique (5mg/kg) d'infliximab. L'étude conclut à une amélioration de différents paramètres histologiques, à savoir le pourcentage de stéatose, le nombre de cellules ballonisées et la bilirubinostase. La biopsie de contrôle, pratiquée à 28 jours post-introduction du traitement n'a cependant pu être pratiquée que chez 4 patients, sans que la raison n'en soit clairement énoncée [69]!

Ceci illustre une fois encore les difficultés quant à la réalisation d'étude prospectives, randomisées et de grande envergure, parmi un tel collectif de patients, lesquelles sont liées notamment aux problèmes de recrutement initial, de compliance au traitement et au suivi médical.

Ainsi, nos résultats seraient à développer dans de nouvelles études randomisées, incluant un plus grand nombre de patients, lesquels accepteraient également de se soumettre à deux biopsies hépatiques de contrôle. Idéalement, la seconde biopsie de contrôle pourrait être effectuée à distance de l'administration de l'infliximab, ce qui permettrait un meilleur bilan histologique de l'évolution des lésions hépatiques.

CONCLUSION

Des études menées sur des rats chroniquement exposés à de l'éthanol ont démontré que l'administration d'anticorps anti-TNF α atténuait les lésions hépatiques nécrotico-inflammatoires [55]. Chez l'homme, ce traitement comporte une efficacité prouvée lors de polyarthrite rhumatoïde ou de maladie de Crohn. Parmi des patients présentant une maladie de Crohn réfractaire, une diminution de l'atteinte inflammatoire a été observée histologiquement 4 semaines après une administration intraveineuse unique d'infliximab, à raison de 5 mg/kg [70].

Ainsi, l'intervalle très court entre l'introduction du traitement et la biopsie de contrôle, lequel était de 10 jours, pourrait expliquer l'absence d'évolution statistiquement significative dans les lésions hépatiques histologiques.

Sur le plan des caractéristiques cliniques, en l'absence d'hémolyse et d'insuffisance rénale sévère, l'observation d'une diminution de la bilirubine sérique dans les patients ayant bénéficié d'infliximab suggère un effet spécifique de cette substance. Aucun effet secondaire aigu n'a été constaté à la suite de l'administration intraveineuse d'infliximab, malgré leur description chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde ou de maladie de Crohn.

Cette étude pilote suggère donc que l'infliximab est bien toléré chez des patients présentant une cirrhose hépatique et une insuffisance hépatique sévère. De plus, la diminution d'un paramètre biologique 10 jours après administration d'infliximab, la bilirubine sérique totale, est un indicateur que de nouvelles stratégies thérapeutiques pourraient désormais inclure un anti-TNF α .

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je souhaiterais remercier vivement mes deux directeurs de thèse, les Docteurs Laura Rubbia-Brandt et Laurent Spahr, pour leur soutien et leurs précieux conseils. Je leur suis reconnaissante de m'avoir offert la possibilité de participer à ce travail de recherche intéressant, motivant et innovateur.

Je dois à la Docteure Rubbia-Brandt le développement initial de mon intérêt pour la pathologie et je la remercie de m'avoir facilité l'accès au domaine de la pathologie hépatique.

Un aspect particulier à la pathologie hépatique tient à la nécessité d'intégrer les éléments cliniques dans l'analyse histologique des lésions. Je remercie le Docteur Spahr, responsable de la cohorte de patients, de nous avoir transmis l'ensemble des éléments cliniques et, surtout, d'encourager et de susciter par son enthousiasme et ses connaissances le dialogue entre cliniciens et pathologistes.

Mes plus sincères remerciements vont également à Madame Nicole Chavaz pour son aide indispensable dans l'évaluation statistique des données, et à Madame Patricia Gindre, qui a procédé aux marquages TUNEL.

BIBLIOGRAPHIE

1. Salaspuro M: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, Oxford University Press, 1999, pp 1157-77
2. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, et al.: Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-9.
3. Ramond MJ, Poynard T, Rueff B, et al.: A randomized trial of prednisolone in patients with severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 1992;326:507-12.
4. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, et al.: Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998;275:G387-92.
5. *Dictionnaire des Sciences Médicales*, Pancoucke CLF, 1812
6. Barbier D: Alcool et alcoolisme: définitions, rappel historique. *Soins* 1997;617:6-8.
7. WHO: Global Status Report on Alcohol. 1999:1-60 et 298-302.
8. Bopp M, Gmel G: Alcohol consumption and gender in the 20th century: the case of Switzerland. *Soz Präventivmed* 1999;44:211-21.
9. Rehm J, Gmel G: Patterns of alcohol consumption and social consequences. Results from an 8-year follow-up study in Switzerland. *Addiction* 1999;94:899-912.
10. WHO: International Guide for Monitoring Alcohol Consumption and Related Harm. 2000:95-141.
11. *Classification Internationale des Troubles Mentaux et des Troubles du Comportement (CIM-10)*, OMS, 1993
12. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR)*, American Psychiatric Association, 2000, pp 213-23
13. Vaillant G: *The Natural History of Alcoholism: Causes, Patterns, and Paths to Recovery*, Harvard University Press, 1983, pp 309-10
14. Morgan M: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, Oxford University Press, 1999, pp 1186-238
15. Preedy VR, Peters TJ, Why H: Metabolic consequences of alcohol dependency. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1997;16:235-56.
16. Maher JJ: Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res World* 1997;21:5-12.
17. Pastino GM, Flynn EJ, Sultatos LG: Genetic polymorphisms in ethanol metabolism: issues and goals for physiologically based pharmacokinetic modeling. *Drug Chem Toxicol* 2000;23:179-201.
18. Lieber CS: ALCOHOL: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 2000;20:395-430.
19. Crabb DW: Pathogenesis of alcoholic liver disease: newer mechanisms of injury. *Keio J Med* 1999;48:184-8.
20. Lieber CS: Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257:59-84.
21. Lindros KO: Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. *J Hepatol* 1995;23 Suppl 1:7-15.
22. Robbins, Cotran: *Pathologic Basis of Disease*, WB Saunders Company, 1999
23. Albano E, French SW, Ingelman-Sundberg M: Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci* 1999;4:D533-40.
24. Lieber CS: Medical disorders of alcoholism. *N Engl J Med* 1995;333:1058-65.
25. Kwo PY, Ramchandani VA, O'Connor S, et al.: Gender differences in alcohol metabolism: relationship to liver volume and effect of adjusting for body mass. *Gastroenterology* 1998;115:1552-7.
26. Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, et al.: Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:502-7.
27. Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, et al.: Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1348-56.
28. Maher JJ: How does estrogen enhance endotoxin toxicity? Let me count the ways. *Hepatology* 1998;28:1720-1.
29. Jarvelainen HA, Lukkari TA, Heinara S, et al.: The antiestrogen toremifene protects against alcoholic liver injury in female rats. *J Hepatol* 2001;35:46-52.
30. Wheater, Burkitt, Daniels: *Histologie fonctionnelle*, Medsi/Mc Graw-Hill, 1988
31. Alcoholic liver disease: morphological manifestations. Review by an international group. *Lancet* 1981;1:707-11.
32. Diehl AM: Alcoholic liver disease: natural history. *Liver Transpl Surg* 1997;3:206-11.

33. Bedossa P, Callard P: [Alcoholic liver disease. From morphology to pathogenesis]. *Ann Pathol* 1995;15:324-31.
34. Friedman SL: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
35. Mallory F: *The principles of pathologic histology*, WB Saunders Company, 1923
36. Stumptner C, Fuchsichler A, Lehner M, et al.: Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation. *J Hepatol* 2001;34:665-75.
37. Jensen K, Gluud C: The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). *Hepatology* 1994;20:1061-77.
38. Saito H, Ishii H: Recent understanding of immunological aspects in alcoholic hepatitis. *Hepatol Res* 2004;30:193-8.
39. Slukvin, II, Boor PJ, Jerrells TR: Initiation of alcoholic fatty liver and hepatic inflammation with a specific recall immune response in alcohol-consuming C57Bl/6 mice. *Clin Exp Immunol* 2001;125:123-33.
40. Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE, et al.: Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 275. *Gastroenterology* 1993;105:254-66.
41. Via CS, Shustov A, Rus V, et al.: In vivo neutralization of TNF-alpha promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol* 2001;167:6821-6.
42. Rust C, Gores GJ: Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-74.
43. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ: Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-44.
44. Day CP: Apoptosis in alcoholic hepatitis: a novel therapeutic target? *J Hepatol* 2001;34:330-3.
45. Holler N, Zaru R, Micheau O, et al.: Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;1:489-95.
46. Schuchmann M, Galle PR: Apoptosis in liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:785-90.
47. Stadelmann C, Lassmann H: Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000;301:19-31.
48. Clot P, Parola M, Bellomo G, et al.: Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterology* 1997;113:265-76.
49. Kono H, Bradford BU, Rusyn I, et al.: Development of an intragastric enteral model in the mouse: studies of alcohol-induced liver disease using knockout technology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7:395-400.
50. Cameron RG, Neuman MG: Novel morphologic findings in alcoholic liver disease. *Clin Biochem* 1999;32:579-84.
51. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, et al.: Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:16-28.
52. Kono H, Rusyn I, Yin M, et al.: NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-72.
53. Nanji AA, Zakim D, Rahemtulla A, et al.: Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alpha and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* 1997;26:1538-45.
54. Foster JR: The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol* 2001;82:171-92.
55. Lieber CS: Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J Hepatol* 2000;32:113-28.
56. Bautista AP: Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 1997;25:335-42.
57. Devalaraja MN, McClain CJ, Barve S, et al.: Increased monocyte MCP-1 production in acute alcoholic hepatitis. *Cytokine* 1999;11:875-81.
58. Kono H, Uesugi T, Froh M, et al.: ICAM-1 is involved in the mechanism of alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1289-95.
59. Loffreda S, Rai R, Yang SQ, et al.: Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. *Gastroenterology* 1997;112:2089-98.
60. Tracey KJ, Cerami A: Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994;45:491-503.

61. Burra P, Hubscher SG, Shaw J, et al.: Is the intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function associated antigen 1 pathway of leukocyte adhesion involved in the tissue damage of alcoholic hepatitis? *Gut* 1992;33:268-71.
62. Yin M, Wheeler MD, Kono H, et al.: Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999;117:942-52.
63. Mathurin P, Duchatelle V, Ramond MJ, et al.: Survival and prognostic factors in patients with severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology* 1996;110:1847-53.
64. Spahr L, Rubbia-Brandt L, Pugin J, et al.: Rapid changes in alcoholic hepatitis histology under steroids: correlation with soluble intercellular adhesion molecule-1 in hepatic venous blood. *J Hepatol* 2001;35:582-9.
65. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, et al.: Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997;26:1530-7.
66. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, et al.: Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003;52:1182-7.
67. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, et al.: A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;39:1390-7.
68. McClain CJ, Hill DB, Barve SS: Infliximab and prednisolone: too much of a good thing? *Hepatology* 2004;39:1488-90.
69. Tilg H, Jalan R, Kaser A, et al.: Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003;38:419-25.
70. Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, et al.: Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999;116:22-8.