

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2004

N°108M

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Anatomie et Cytologie Pathologiques

par

Frédérique BLANCHOT-JOSSIC

Née le 1^{er} janvier 1973 à Lons-Le Saunier

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 avril 2004

ROLE DES MITOCHONDRIES DANS LES STEATOSES ET LES STEATOHEPATITES NON
ALCOOLIQUES

Président : Monsieur le Professeur LABOISSE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur MOSNIER

1. INTRODUCTION

Le syndrome anatomo-clinique dysmétabolique désigné par l'acronyme anglo-saxon NAFLD pour "Non Alcoholic Fatty Liver Disease" inclut les lésions de stéatose et de stéatohépatite non alcoolique (SHNA). Ce syndrome dysmétabolique est de plus en plus fréquent et pose un véritable problème de santé publique du fait de l'accroissement de l'obésité dans les pays occidentaux. Cette entité touche particulièrement la femme d'âge moyen, présentant un surpoids, dans un contexte de pathologie métabolique souvent multifactorielle associant un diabète non-insulinodépendant, une dyslipidémie, et une hypertension artérielle. La complication majeure de la NAFLD est son évolution fibrosante qui peut à terme aboutir à une cirrhose.

La pathogénie de la NAFLD est mal connue. L'hypothèse d'une évolution en 2 phases a été proposée: 1) une première phase de stéatose par accumulation des acides gras dans les hépatocytes, conséquence de l'insulinorésistance périphérique associée aux pathologies métaboliques comme le diabète et l'obésité, 2) une deuxième phase liée au stress oxydatif responsable de dommages cellulaires et du passage à la stéatohépatite caractérisée par son activité nécrotico-inflammatoire. La mitochondrie semble jouer un rôle important dans ces 2 phases compte tenu de sa place dans la β oxydation des acides gras et dans la respiration, source des produits réactifs de l'oxygène. La mitochondrie a été proposée comme élément clé de la physiopathologie de la NAFLD en raison de ses similitudes avec la maladie alcoolique du foie pour laquelle des anomalies du génome mitochondrial ont été démontrés.

Jusqu'à présent, le rôle du stress oxydatif et de la mitochondrie dans la physiopathologie des maladies hépatiques ne pouvait être abordé que par des techniques biochimiques. La disponibilité d'anticorps monoclonaux utilisables en immunohistochimie permet de les localiser *in vivo*. En effet,

Papotti et al. ont caractérisé un anticorps anti-mitochondrie. Cet anticorps reconnaît une protéine mitochondriale de 60 kDa, non glycosylée dont la structure exacte ainsi que la fonction ne sont pas connues. La spécificité de cet anticorps a été confirmée par l'étude des mégamitochondries dans la maladie alcoolique du foie de Foschini *et al.*. Le stress oxydatif peut être mis en évidence par un anticorps dirigé contre les nitrotyrosines déjà utilisé dans plusieurs études.

Introduction

Le but de ce travail était de comparer les variations d'expression des mitochondries et du stress oxydatif avec l'activité nécrotico-inflammatoires et l'extension de la fibrose dans la NAFLD.

2. MISE AU POINT

2.1 Les stéatoses et stéatohépatites non alcooliques

2.1.1 Epidémiologie

Le syndrome anatomo-clinique dysmétabolique désigné par l'acronyme anglo-saxon NAFLD pour "Non Alcoholic Fatty Liver Disease" inclut les lésions de stéatose et de stéatohépatite non alcoolique (SHNA). Cette pathologie devient la maladie du foie la plus fréquente dans les pays industrialisés où sa fréquence s'accroît parallèlement à celle de l'obésité. Les courbes de progression de l'obésité sont actuellement identiques en France et aux Etats Unis. Plus de 13 millions de Français ont un surpoids et environ 10% de la population est obèse. La prévalence exacte de la NAFLD n'est pas connue mais elle est estimée à environ 20%. Les patients atteints de SHNA représenteraient entre 2 et 3% de la population générale et environ 18,5% de la population obèse.

Le principal facteur de risque de la NAFLD est l'obésité, définie par un indice de masse corporelle supérieur à 29,5 kg/m². La stéatose est observée chez 70% des patients ayant un surpoids et tous les patients présentant une obésité morbide. Elle est retrouvée chez 30 à 100% des patients atteints de SHNA.

Les autres facteurs de risque de la NAFLD sont le diabète non insulino-dépendant (DNID), l'hyperlipidémie et l'hypertension artérielle. Les patients présentant un DNID ont un risque 2,6 fois plus important de développer une SHNA par rapport à la population générale. L'hyperlipidémie est retrouvée chez 92 % des patients atteints de SHNA.

Dans une moindre mesure, la NAFLD peut être associée à la nutrition parentérale, à une perte de poids trop rapide secondaire à une malabsorption, une dysthyroïdie, une maladie de Kwashiorkor ou encore un traitement chirurgical de l'obésité (diversion biliopancréatique, gastropexie), et à la prise de certains médicaments (amiodarone, corticoïdes, estrogènes...).

Initialement décrite chez la femme d'âge moyen, la NAFLD touche actuellement les deux sexes. Cependant il persiste une relative prédominance chez la femme avec un risque de progression considéré comme plus élevé.

2.1.2 Clinique

§ Symptômes

La NAFLD est le plus souvent asymptomatique. Les symptômes, lorsqu'ils sont présents, sont non spécifiques. Les patients se plaignent d'asthénie, de douleurs de l'hypochondre droit ou de pesanteur abdominale. Une hépatomégalie peut être retrouvée à l'examen physique dans 75 % des cas mais l'examen est difficile en cas d'obésité.

Le diagnostic est souvent précoce mais la maladie est parfois révélée par la cirrhose. Les signes sont alors ceux d'une maladie chronique du foie avec insuffisance hépatocellulaire (ictère, angiomes stellaires,...) et hypertension portale (ascite, splénomégalie...) chez des patients ayant les caractéristiques cliniques d'une NAFLD et en l'absence de toute autre maladie chronique du foie.

§ Biologie

Les anomalies biologiques observées dans la NAFLD ne sont pas plus spécifiques. Une élévation légère à modérée (jusqu'à 5 fois la normale) de l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et/ou de l'alanine aminotransférase (ALAT) est le signe le plus fréquemment rencontré et, plus encore, le principal signe révélateur de la NAFLD. Le ratio ASAT/ALAT est généralement inférieur à 1. Ce ratio est de valeur diagnostique en l'absence de fibrose dans la mesure où il est supérieur à 1 dans la maladie alcoolique du foie. Les taux sériques de phosphatase alcaline, de bilirubine totale et de γ -glutamyltransférase (γ -GT) peuvent être légèrement augmentés.

2.1.3 Diagnostic

Le diagnostic de NAFLD est suspecté devant un patient présentant un ou plusieurs facteurs métaboliques associés à des anomalies biologiques hépatiques en l'absence d'une consommation excessive d'alcool. La consommation excessive d'alcool pur est définie par une consommation quotidienne de 20 g/j depuis la conférence de consensus de l'American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) en 2002. Devant ce tableau clinique, l'imagerie met en évidence une stéatose et, parfois, un foie augmenté de volume. La stéatose est le plus souvent diffuse, rarement focale, nodulaire. Dans ce contexte, pourquoi réaliser une ponction-biopsie hépatique? La ponction-biopsie hépatique permet 1) de confirmer le diagnostic de NAFLD, 2) d'apprécier l'activité nécrotico-inflammatoire de la maladie de valeur évolutive, 3) d'évaluer le degré de fibrose de valeur pronostique, et 4) de rechercher d'autres hépatopathies associées.

2.1.4 Histologie

Les critères histologiques diagnostiques de la SHNA ont été définis initialement par Ludwig et al. en 1980. Depuis, le champ des pathologies dysmétaboliques du foie s'est considérablement élargi. Il mêle les lésions de stéatose et de stéatohépatite dont la complication majeure est l'évolution fibrosante voire la cirrhose. Les lésions significatives de la NAFLD varient selon les études mais certains critères

sont considérés comme nécessaires au diagnostic. La stéatose a une valeur diagnostique et d'orientation étiologique. Elle peut être associée ou non à un infiltrat inflammatoire intra-lobulaire, à une nécrose de ballonnisation des hépatocytes et à des corps de Mallory. L'infiltrat inflammatoire et la nécrose représentent l'activité de la NAFLD, appelée activité nécrotico-inflammatoire. Cette activité a une valeur évolutive. D'autres signes histologiques peuvent être observés comme un infiltrat inflammatoire portal, des noyaux glycogéniques et des mégamitochondries. Au cours de l'évolution de la maladie, une fibrose peut apparaître. D'abord localisée, centrolobulaire et périportale, cette fibrose peut s'étendre avec pour conséquence la constitution d'une cirrhose.

La stéatose est visible sans coloration spéciale. Elle est le plus souvent macrovacuolaire, plus rarement mixte avec un contingent minime microvacuolaire. La stéatose macrovacuolaire est définie par la présence d'une seule vacuole intra-cytoplasmique, optiquement vide, refoulant le noyau en périphérie. Les hépatocytes atteints sont augmentés de taille. Dans la stéatose microvacuolaire, le noyau reste en position centrale et le cytoplasme contient de multiples petites vacuoles. Le degré de stéatose est variable, il est corrélé à la sévérité de l'obésité.

L'infiltrat inflammatoire lobulaire est mixte, constitué à la fois de polynucléaires neutrophiles et de cellules mononucléées dispersés. La présence des polynucléaires est caractéristique de la stéatohépatite, la distinguant des autres formes de maladies chroniques du foie. Cet infiltrat peut être associé à un infiltrat inflammatoire portal mononucléé, d'intensité légère à modérée.

La nécrose de ballonnisation est un signe de souffrance des hépatocytes. Elle est caractérisée par des hépatocytes augmentés de volume avec un cytoplasme rétracté, finement granulaire. Cette nécrose de ballonnisation est observée de façon prédominante dans la zone 3 de Rappaport. Les corps de Mallory sont des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles d'aspect enrubanné, souvent périnucléaires. Ils correspondent à des agrégats de peptides du cytosquelette.

L'extension de la fibrose dans la NAFLD est particulière. Les dépôts de collagène sont observés initialement au niveau des parois des veines centro-lobulaires et le long des sinusoides. Cette caractéristique est également observée dans la maladie alcoolique du foie (MAF). Cette constitution de la fibrose, dans la NAFLD et la MAF, permet de les distinguer des autres maladies chroniques du foie où la fibrose se développe à partir de l'espace porte. Au cours de l'évolution, cette caractéristique disparaît avec l'apparition d'une fibrose portale et la formation de septa reliant les espaces portes entre eux ou avec les veines centro-lobulaires. Le stade ultime est la cirrhose avec la présence d'une fibrose annulaire délimitant des nodules de régénération.

Du fait de l'évolution possible de la stéatose en stéatohépatite caractérisée par son activité nécrotico-inflammatoire et de la valeur pronostique de la fibrose, il serait intéressant de disposer d'une classification permettant de repérer les patients évolutifs, d'évaluer un pronostic et d'assurer un suivi.

Il n'existe pas actuellement de consensus établi pour définir une classification de la NAFLD. Une tentative d'application des différents systèmes de classification des hépatites chroniques (METAVIR, Knodell et Scheuer) n'a pas montré une bonne reproductibilité surtout en ce qui concerne la fibrose. En effet, les critères d'activité et de fibrose de la NAFLD sont différents de ceux des autres hépatopathies chroniques, virales ou auto-immunes et l'établissement d'une classification nécessite des critères spécifiques de la maladie. Deux classifications ont été proposées, basées sur les critères déjà décrits. Un système de " grading " pour la stéatose, l'infiltrat inflammatoire et la nécrose de ballonnisation associé à un " staging " de la fibrose a été utilisé par Brunt et al. dans le but d'uniformiser le diagnostic de SHNA. Son évaluation est en cours même s'il a déjà été utilisé dans certaines études. Une classification de la NAFLD a également été proposée par Matteoni et al. dans le but de corrélérer ces critères avec un pronostic à long terme. La classe 1 constitue la simple stéatose, la classe 2, la stéatose associée à l'inflammation lobulaire, la classe 3 y ajoute la ballonnisation hépatocytaire et la classe 4 la présence de corps de Mallory et de la fibrose. Pour les classes 3 et 4, la fibrose est répartie en 4 types. Cette classification ne fait pas l'unanimité. En effet, les classes 3 et 4 sont très proches et pourraient ne constituer qu'un seul groupe représentant la SHNA. Le pronostic lié à la classe 2 est incertain, avec une évolution potentiellement bénigne malgré l'inflammation.

2.1.5 Evolution

L'étude de l'évolution de la NAFLD montre tout l'intérêt de la ponction-biopsie hépatique puisque stéatose et stéatohépatite semblent avoir des évolutions différentes. Les études évolutives des NAFLD montrent que les patients présentant une stéatose sur leur biopsie initiale évoluaient rarement vers la cirrhose. Par contre, lorsqu'il existait une stéatohépatite, l'évolution vers la cirrhose était plus fréquente, de 14% à 28% selon les séries.

La stéatose n'évolue donc pas généralement vers la cirrhose. Toutefois, dans les conditions particulières de la stéatose survenant sur transplant hépatique, une évolution vers la stéatohépatite voire la cirrhose a été observée sur le transplant.

La SHNA peut évoluer vers une cirrhose. L'estimation de la prévalence de la survenue d'une cirrhose au cours de la SHNA est difficile. Les informations dont on dispose sont indirectes : d'une part les cirrhoses développées à partir d'une SHNA représentent 2,9 % des transplantations hépatiques, d'autre part la SHNA est considérée comme la principale cause de cirrhoses cryptogénétiques. Au cours de l'évolution post-transplantation de cirrhoses cryptogénétiques, 60 % ont présenté une stéatose, 33 % une stéatohépatite avec 12,5 % de progression vers la cirrhose.

Toutefois les critères histologiques ne sont pas les seuls à avoir une valeur évolutive. Certains facteurs cliniques sont aussi de valeur pronostique comme l'âge au moment du diagnostic (\geq à 45 ans), l'obésité, la présence d'un DNID. Ces facteurs prédiraient la survenue de la fibrose chez les patients atteints de SHNA.

La surveillance prolongée montre que les NAFLD au stade de cirrhose peuvent être compliquées de carcinome hépatocellulaire. Le risque est tout de même moins élevé (2,3%) que pour les hépatites chroniques virales B et C (respectivement 9,4% et 5%) ou au cours de la maladie alcoolique du foie (4%).

2.1.6 Pathogénie

Le développement de la stéatose, de la stéatohépatite et la progression vers la cirrhose sont le résultat de multiples anomalies non élucidées. Tous les facteurs gouvernant l'évolution de la NAFLD vers la cirrhose ne sont pas connus. Day et James ont avancé l'hypothèse d'une évolution en deux phases. La première phase serait la constitution de la stéatose par l'accumulation d'acides gras dans les hépatocytes. La deuxième phase serait représenté par l'intervention du stress oxydatif capable d'induire la peroxydation lipidique et donc de déclencher la stéatohépatite par l'atteinte de la bicouche lipidique de la membrane des cellules, la stimulation des polynucléaires, l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-KB et l'évolution fibrosante par activation des cellules stellaires hépatiques. L'accumulation d'acides gras intra-hépatique serait le résultat de l'insulinorésistance observée fréquemment dans les NAFLD. En effet, les conséquences de l'insulinorésistance sont 1) une hyperinsulinémie qui a pour effet d'augmenter la glycolyse et donc la synthèse d'acide gras par l'hépatocyte, et 2) une lyse des adipocytes avec augmentation du taux d'acides gras circulants. L'accumulation d'acides gras dans l'hépatocyte entraîne la saturation du système de dégradation par la β oxydation mitochondriale et génère un stress oxydatif responsable des dommages cellulaires. Des anomalies mitochondriales sont également mises en cause. En effet, la mitochondrie est la principale source de produits réactifs de l'oxygène (ROS et RNOS) au niveau de la chaîne respiratoire. De plus, la NAFLD présente des similitudes histologiques avec la maladie alcoolique du foie pour laquelle des anomalies mitochondriales ont été mises en évidence. Ces anomalies rendraient l'hépatocyte plus sensible au stress oxydatif. Cette hypothèse est proposée pour expliquer la différence d'évolution entre les patients atteints de NAFLD, les porteurs de ces anomalies évoluant vers la stéatohépatite.

2.2 La mitochondrie

2.2.1 Le génome mitochondrial

La mitochondrie est un organe particulier car elle possède son propre génome. L'ADN mitochondrial (mt) (cf. figure 1) est circulaire et comporte 16569 paires de bases. Plusieurs copies du génome mitochondriale sont présentes au sein d'une même mitochondrie. Ce génome est d'origine maternelle et code pour 2 ARN ribosomiaux et 22 ARN de transfert. Il produit 13 protéines essentielles de la chaîne respiratoire (3 sous-unités de la cytochrome oxydase, 7 sous-unités de la NADH déshydrogénase, 2 sous-unités de l'ATP synthétase et le cytochrome b). L'ADNmt est plus sensible aux mutations que l'ADN nucléaire du fait de l'absence de protection par des histones, de l'absence de système de réparation des gènes et par sa proximité d'une source de radicaux libres. Les mutations peuvent affecter toutes les copies (homoplasmie) ou une partie seulement (hétéroplasmie) des copies du génome mitochondrial d'une cellule. Les mutations du génome mitochondrial peuvent être héritées ou sporadiques. Un effet délétère est observée sur la fonction respiratoire de la cellule lorsqu'environ 80% des copies du génome mitochondrial sont mutées.

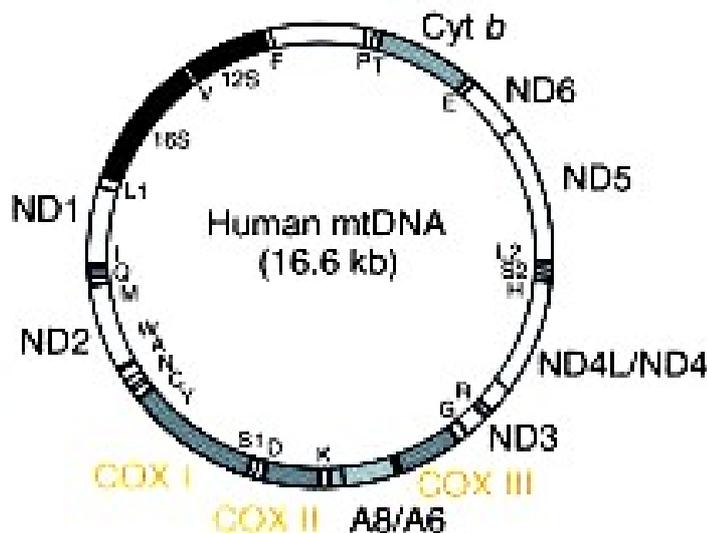


Figure 1: génome mitochondrial (Schon, 2003)

2.2.2 La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organe intra-cellulaire indispensable à la vie humaine du fait de son rôle de "convertisseur d'énergie". Elle utilise l'énergie de certaines réactions cellulaires pour synthétiser l'ATP (adénosine triphosphate) utilisable par la cellule. C'est en effet au sein de la matrice mitochondriale que sont effectuées la plupart des oxydations cellulaires comme celle du pyruvate issu de la dégradation du glucose, celle des acides gras en acétyl CoA qui lui-même entre ensuite dans le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs. De grande quantité de NADH et FADH₂ sont produites au cours de ces réactions. Ces produits permettent le transport d'électrons réactifs. Ces électrons sont ensuite combinés à l'oxygène moléculaire dans la chaîne respiratoire, située dans la membrane interne mitochondriale (cf. figure 2). Cette chaîne respiratoire est constituée de 5 complexes enzymatiques codés par l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Les 4 premiers, NADH deshydrogénase (I),

succinate deshydrogénase (II), cytochrome b-c1 (III) et cytochrome a-a3 oxydase (IV), permettent le pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire en utilisant l'énergie du transfert d'électrons d'un complexe à l'autre. L'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire entraîne un gradient électrochimique responsable d'un flux de protons au travers de l'ATP synthase, le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Ce flux permet la conversion de l'ADP (adénosine diphosphate) en ATP. Les protons interagissent avec les électrons et l'oxygène pour former de l'eau. Toutes ces réactions sont regroupées sous le terme de phosphorylation oxydative.

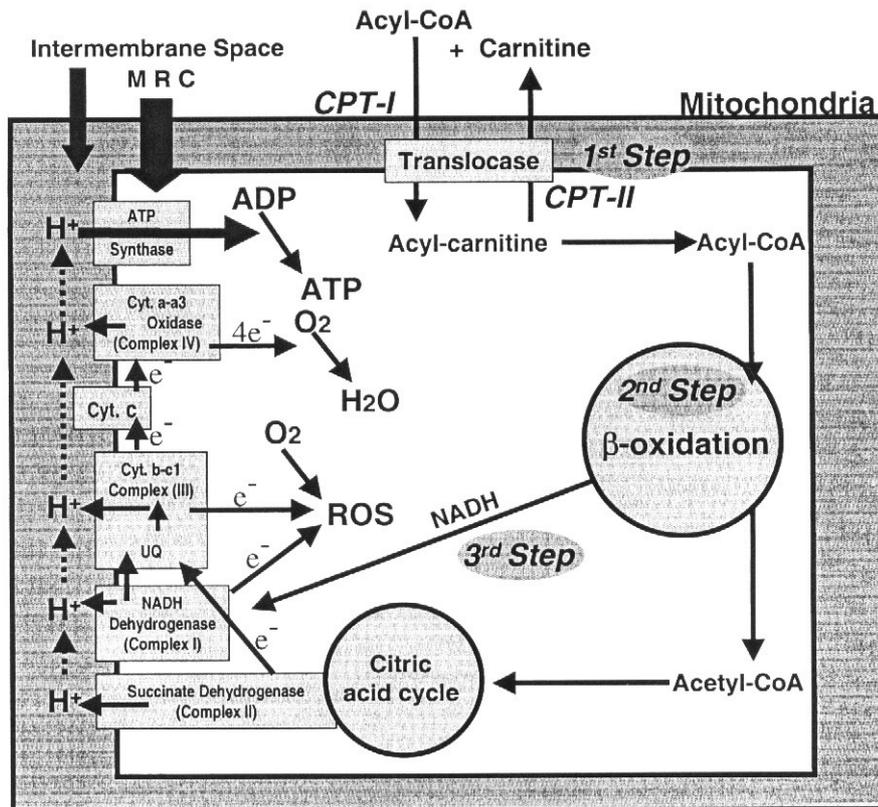


Figure 2 : chaîne respiratoire mitochondriale (Pérez-Carreras et al., 2003)

2.2.3 Mise en évidence morphologique

La mitochondrie mesure à l'état normal de 0,5 à 1 µm. Elle est donc difficilement observable en microscopie photonique sauf dans certaines conditions pathologiques. En effet, au cours de la maladie alcoolique du foie, on peut observer des mégamitochondries. Dans les tumeurs oxyphiles, la mitochondrie est présente en grande quantité donnant alors au cytoplasme un aspect granité éosinophile particulier.

Cependant, cet aspect peut résulter de l'accumulation d'autres organites et c'est la microscopie électronique qui permet une étude plus précise de la composition en organites du cytoplasme. Elle permet également une étude de la morphologie mitochondriale et la mise en évidence d'inclusions paracrystallines décrites dans certaines pathologies mitochondriales.

Une étude immunohistochimique peut également mettre en évidence la mitochondrie dans les

cellules et les tissus. Les anticorps dirigés contre des protéines mitochondriales ne sont pas nombreux : l'anticorps anti-mitochondries caractérisé en 1994 par Papotti et al. et dont la spécificité a été étudié par Foschini et al., des anticorps dirigés contre les sous-unités 1 et 2 de la cytochrome oxydase. Ces anticorps peuvent être utilisés en microscopie optique avec une méthode classique en 3 couches d'immunopéroxydase indirecte ou en microscopie électronique à l'aide d'anticorps marqués par des billes d'or colloïdal.

Une étude fonctionnelle de la mitochondrie peut être réalisé par une méthode simple d'histoenzymologie. Cette méthode repose sur la capacité de l'enzyme à cliver un substrat en deux produits. L'un des produits est insoluble et colorable. La réaction enzymatique est alors visualisable sous forme d'un piqueté coloré du cytoplasme. Cette méthode peut s'appliquer à la cytochrome oxydase et à la succinate deshydrogénase, complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale.

2.3 Le stress oxydatif

2.3.1 Généralités

Le stress oxydatif résulte de la rupture d'équilibre entre la production de radicaux libres et les systèmes de détoxification de l'organisme.

Il existe 2 types de stress, oxydatif à partir des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et nitré à partir des produits dérivés du monoxyde d'azote (NO°) (cf. figure 3).

Le peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2 est produit à partir de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) soit par la NAPDH oxydase des polynucléaires soit par la superoxyde dismutase (SOD). Les systèmes de détoxification de la cellule, la catalase et la glutathione peroxydase, permettent sa transformation en eau. Mais H_2O_2 peut aussi être utilisé comme substrat par la myéloperoxydase (MPO), enzyme sécrétée par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, pour convertir l'ion chlorure (ClO^-) en acide hypochloreux (HOCl). L'acide hypochloreux est un puissant agent bactéricide mais il est également responsable de dommage cellulaire par chlorination des résidus tyrosine des protéines et des acides nucléiques.

L' H_2O_2 est également responsable de la peroxydation lipidique qui aboutit à la destruction des acides gras polyinsaturés des membranes. Les produits de cette peroxydation sont toxiques et entraînent un dysfonctionnement cellulaire avec atteinte de la synthèse protéique et nucléique.

l'anion superoxyde peut également se fixer au monoxyde d'azote (NO°) pour lequel il a d'ailleurs une plus forte affinité que pour la SOD. Cette réaction ne peut intervenir que si les concentrations de NO° et d' $\text{O}_2^{\circ-}$ sont importantes et équivalentes. Elle aboutit à la formation de peroxynitrite (ONOO^-), puissant oxydant. Il est responsable de la nitration des résidus tyrosines des protéines en se décomposant en radical hydroxyl (OH^\cdot) et en dioxyde nitrogène (NO_2°). Les nitrations des protéines sont des modifications post-traductionnelles qui peuvent avoir des conséquences sur leur fonction biologique (gain ou perte de fonction). L'action du peroxynitrite est limitée au site de sa production.

Le NO° est un gaz radicalaire (NO°) caractérisé par la présence d'un électron libre sur sa couche externe. Il est le produit de la transformation de la L-arginine en L-citrulline. Il est synthétisé en grande quantité par l'isoforme inductible de la nitric oxyde synthase (iNOS) lors d'atteintes inflammatoires ou dans certaines pathologies tumorales pour participer aux mécanismes de défense immunitaire de l'organisme. Le NO° est instable à cette concentration et peut former du peroxynitrite ou s'autoxyder en milieu aérobie en formant avec l'oxygène des dérivés NO_x tel que NO_2 , N_2O_2 et N_2O_4 . Ces dérivés sont responsables de réactions de nitrosations, par fixation d'un groupement NO^+ , essentiellement au niveau des thiols voire des bases nucléiques et de la peroxydation lipidique.

Le NO° peut également former en présence d' OH^\cdot , en solution aqueuse, un anion nitrite NO_2^- . Le NO_2^- peut servir de substrat à la MPO pour donner du dioxyde nitrogène (NO_2°) ou former du NO_2Cl avec

l'acide hypochloreux. Le NO_2° et le NO_2Cl sont responsables de nitration des résidus tyrosines par fixation d'un groupement NO_2^+ au niveau du cycle aromatique de la tyrosine. La MPO étant une enzyme active dans la cellule et son environnement extracellulaire, les dommages causés par le NO_2Cl sont étendus.

Le NO° peut également être produit à faible concentration par les isoformes constitutives de la NOSynthase (nNOS, neuronale, et eNOS, endothéliale). Il est alors stable et réagit facilement avec le fer hémique présent dans les hémoprotéines ou les enzymes hémiques (guanylate cyclase soluble, GCs), et dans les centres fer-soufre des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. Paradoxalement, le NO° est alors impliqué dans la signalisation intra-cellulaire par activation directe de la GCs avec pour conséquence une augmentation de la concentration de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui contrôle entre autres, les canaux ioniques. Le NO° agit alors comme neurotransmetteur dans le système nerveux ou comme vasodilatateur.

Une α isoforme de la nNOS est capable de produire du NO° dans la mitochondrie : il s'agit de la mtNOS. Le NO° produit interagit avec la cytochrome oxydase (complexe IV) pour moduler la respiration mitochondriale. Par conséquent, cette interaction a également un rôle dans la production d'ATP et de produits réactifs de l'oxygène.

2.3.2 Mise en évidence morphologique

La visualisation immunohistochimique des marqueurs moléculaires du stress oxydatif est relativement récente. Elle a apporté beaucoup d'informations sur la distribution *in vivo* des dommages liés au stress oxydatif. Les marqueurs de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonanal, et des acides nucléiques, le 8-desoxydeoxyguanosine peuvent être mis en évidence par immunohistochimie. Nous disposons également d'anticorps dirigés contre les protéines ayant subi des nitrations ou des nitrosations.

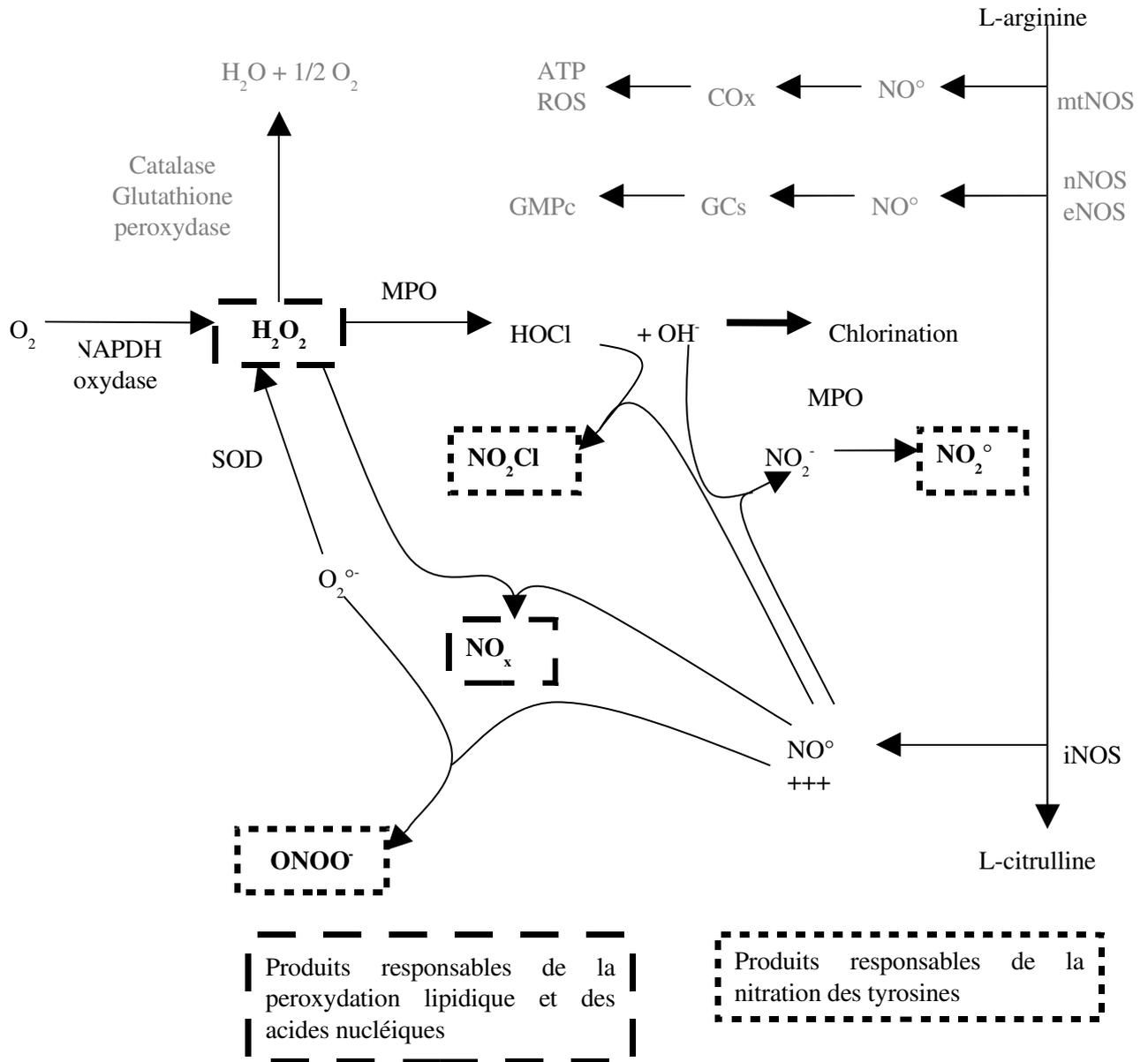


Figure 3 : le stress oxydatif

3. MATERIELS ET METHODES

3.1 Patients

Quinze patients consécutifs, investigués entre octobre 2002 et novembre 2003 dans le service de Gastro-entérologie et Hépatologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Nantes, ont été inclus dans l'étude. Les critères d'inclusion étaient 1) un diagnostic histologique de stéatose ou de stéatohépatite, 2) un interrogatoire et un bilan clinique excluant un alcoolisme chronique.

Le diagnostic histologique de stéatohépatite était posé selon les critères établis: stéatose, infiltrat inflammatoire lobulaire mixte et nécrose de ballonisation.

La consommation d'alcool était précisée par l'interrogatoire du malade, de son entourage et par plusieurs médecins consultants. Une consommation d'alcool pur supérieure à 20g/j dans les deux sexes entraînait l'exclusion du patient.

Les données cliniques colligées au moment de chaque biopsie étaient le sexe, l'âge, la taille et le poids, les prises médicamenteuses, l'existence d'un diabète, d'une hypertension artérielle, de maladies extra-hépatiques associées. L'indice de masse corporelle défini par le rapport poids/taille² était calculé. Un indice de masse corporelle compris entre 18,5 et 23,5 chez l'homme, 19,5 et 24,5 chez la femme définissait la surcharge pondérale. Un indice de masse corporelle supérieur à 29,5 dans les deux sexes définissait l'obésité.

Un bilan biologique était réalisé systématiquement :

un bilan hépatique complet : transaminases (ASAT : N <31 UI/l, ALAT : N <31 UI/l, ASAT/ALAT : N <1), phosphatases alcalines (N <141 UI/l), γ GT (N <32 UI/l), bilirubine totale (N <17 μ mol/l),

un bilan du métabolisme du fer : fer sérique, ferritinémie, transferrinémie, coefficient de saturation de la transferrine, capacité totale de fixation du fer et recherche des mutations C282Y et H63D du gène de l'hémochromatose

le dosage du cholestérol total (N <6,8 mmol/l) et des triglycérides (N <1,5 mmol/l),

les sérologies des virus des hépatites B et C,

la détection des anticorps anti-noyaux, anti-muscle lisse, anti-mitochondries et anti-liver kidney microsomes (LKM).

3.2 Matériels et méthodes

Tous les patients ont subi une ponction-biopsie hépatique transpariétale sauf 6 chez qui elle a été réalisée par voie transjugulaire et 3 par voie chirurgicale au cours d'un traitement chirurgical pour obésité morbide.

3.2.1 Etude histologique

Les prélèvements ont été fixés dans le formol tamponné à 10% puis deshydratés et inclus en paraffine. A partir de chaque bloc étaient réalisées des coupes sériées de 4 μ m d'épaisseur. Les colorations utilisées étaient :

l'hématoxyline-éosine-safran (HES) pour analyser l'architecture globale du parenchyme hépatique, les anomalies hépatocytaires et l'infiltrat inflammatoire,

le picosirius pour rechercher les dépôts de collagène et déterminer leur localisation,

la coloration de Perls pour mettre en évidence une éventuelle surcharge ferrique ainsi que sa localisation, hépatocyttaire, kupfférienne et/ou macrophagique.

Huit à douze plans de coupes au total étaient examinés pour chacun des patients.

Différents critères histologiques étaient systématiquement analysés : 1) la stéatose, 2) l'activité nécrotico-inflammatoire et 3) les lésions associées. Elles étaient évaluées semi-quantitativement, d'après les critères du grading pour l'activité et du staging pour la fibrose de Brunt et al. (cf. tableau 1).

§ La stéatose

Elle était appréciée selon son type micro et/ou macrovacuolaire, son étendue : 1+ = jusqu'à 33% d'hépatocytes stéatosiques, 2+ = de 33% à 66%, 3+ = plus de 66%. L'existence d'une systématisation était notée.

§ L'activité nécrotico-inflammatoire

L'infiltrat inflammatoire intra-lobulaire était gradé selon sa sévérité : 0 = absent, 1+ = discret, 2+ = modéré, 3+ = marqué. La présence de polynucléaires était notée. La nécrose de ballonnisation et les corps de Mallory étaient appréciés selon leur absence (= 0) ou leur présence (= 1+).

§ La fibrose

Elle était gradée de 0 à 4 : 0 = absente, 1 = élargissement des espaces portes sans formation de septa, 2 = élargissement des espaces portes avec quelques septa fibreux, 3 = présence de nombreux septa, 4 = cirrhose.

§ Les lésions associées

La présence de noyaux glycogéniques, de lipogranulomes, d'une cholestase intra-lobulaire, de mégamitochondries, d'un infiltrat inflammatoire intra-portal, de lésions de nécrose parcellaire de la lame bordante, ainsi qu'une prolifération néoductulaire et des lésions des canaux biliaires étaient recherchées. Une évaluation semi-quantitative de la charge hépatique en fer selon Deugnier et Turlin (cf. tableau 2) était réalisée.

Tableau 1 : système de "grading" et "staging" de la SHNA (Brunt et al., 1999)

Grade 1 :

Stéatose macrovacuolaire, de 33 à 66 % des hépatocytes

Rares hépatocytes en nécrose de ballonisation dans la zone 3

Inflammation lobulaire légère (quelques polynucléaires neutrophiles et cellules mononucléées dispersées)

Inflammation portale absente, légère

Grade 2 :

Stéatose quelque soit son importance, souvent mixte, macro et microvacuolaire

Nécrose de ballonisation des hépatocytes de la zone 3

Inflammation légère faite de cellules mononucléées et de polynucléaires

Inflammation portale absente, légère ou modérée

Grade 3 :

Stéatose macro et microvacuolaire, de 66 % à 100% des hépatocytes

Nécrose de ballonisation marquée, prédominant dans la zone 3

Inflammation lobulaire mononucléée et polynucléée diffuse

Inflammation portale légère ou modérée ; non prédominante ou marquée

Stage 1 : fibrose périsinusoïdale ou périveinulaire, focale ou extensive

Stage 2 : stage 1 plus fibrose portale focale ou extensive

Stage 3 : fibrose en pont, focale ou extensive

Stage 4 : cirrhose avec ou sans fibrose périsinusoïdale résiduelle

Tableau 2. Evaluation semi-quantitative de la charge hépatique en fer selon Deugnier et Turlin

Score hépatocytaire	0, 3, 6, 9 ou 12 dans chaque zone de Rappaport selon la taille des grains
Score sinusoidal	0, 3, 6, 9 ou 12 dans chaque zone de Rappaport selon la taille des grains
Score portal	0, 1, 2, 3 ou 4 dans chaque secteur conjonctif, biliaire et vasculaire
Score total	0 à 60, 0 corriger selon homogénéité par coefficient 3/3, 2/3 ou 1/3

3.2.2 Etude immunohistochimique

Cette étude a été réalisée sur les mêmes prélèvements fixés dans le formol et inclus en paraffine. Des coupes de 4 µm étaient déposées sur lames silanisées SuperFrost®.

§ Anticorps primaires

Anticorps	Clone	Laboratoire	Dilution	Micro-onde
Mitochondries	113-1 mono	Biogenex	1/50	O
nitrotyrosine	1A6 mono	Upstate	1/500	N
AML	1A4 mono	Sigma	1/400	N
CD68	KP1	Dako	1/50	O
MPO	poly	Dako	1/1000	N

Anticorps primaires utilisés : AML (actine musculaire lisse), MPO (myéloperoxydase) ; mono (monoclonal), poly (polyclonal); Biogenex (San Ramon, Californie), Dako (Glostrup, Danemark), Upstate Biotechnology Inc (Saranac Lake, New York), Sigma (Saint Louis, Missouri).

§ Technique

L'étude a été effectuée grâce à une méthode en trois couches indirectes, streptavidine-biotine couplée à la peroxydase, à l'aide d'un automate (Labvision, Immunotech) sauf pour l'anticorps anti-nitrotyrosine.

Le protocole utilisé se décompose en 2 étapes :

une étape manuelle de déparaffinage

Une restauration antigénique par la chaleur au bain-marie dans un tampon citrate pH 7,2 a été réalisée pour les anticorps anti-mitochondries et anti-CD68.

une étape automatisée comprenant un rinçage par du tampon PBS, une inhibition des peroxydases endogènes par l'H₂O₂ 3% pendant 5 minutes, un rinçage par le PBS, l'anticorps primaire : 30 minutes, un rinçage par du PBS, l'anticorps secondaire biotinylé : 20 minutes ; un rinçage dans du PBS ; streptavidine : 20 minutes ; un dernier un rinçage dans du PBS ; la révélation par le chromogène (DAB : diaminobenzidine): 10 minutes suivie d'un rinçage à l'eau puis contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer : 1 minute.

Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool absolu puis montées avec le milieu Consulmount®.

Pour l'anticorps anti-nitrotyrosine, une étape de blocage spécifique de l'anticorps primaire a été réalisée pour mettre en évidence la spécificité du marquage. La solution de blocage était obtenue par incubation pendant 1 heure à température ambiante de l'anticorps primaire avec de la 3-nitrotyrosine, le pH étant ajusté à 7,4 par de la soude (NaOH 1M).

§ Interprétation du marquage

Les mitochondries intra-hépatocytaires marquées par l'anticorps 113-1 apparaissaient sous la forme de petits grains intra-cytoplasmiques. Une analyse de la répartition au sein des lobules était réalisée. Le marquage cytoplasmique de l'épithélium des canaux biliaires servait de témoin positif interne.

L'anticorps anti-nitrotyrosine est utilisé pour mettre en évidence la présence de la nitration des résidus tyrosine des protéines qui est un marqueur du stress oxydatif.

L'anticorps anti-actine musculaire lisse a été utilisé pour mettre en évidence les cellules stellaires hépatiques activées.

La molécule CD68 est présente dans le cytoplasme des macrophages et des cellules de Kupffer.

La myéloperoxydase est une enzyme synthétisée par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules de Kupffer. Elle est impliquée, comme nous l'avons décrit plus haut, dans la synthèse de dérivés nitrés et de l'acide hypochloreux.

L'étude immunohistochimique de fragments hépatiques normaux prélevés à distance de métastases d'adénocarcinome colique, de taille à peu près identique aux biopsies étudiées servait de contrôle.

Une analyse de la positivité du marquage, de son intensité et de sa répartition au sein de parenchyme hépatique a été réalisé pour chaque anticorps.

4. RESULTATS

Quinze patients atteints de NAFLD ont été inclus dans l'étude. Il s'agissait de 7 femmes (46,6%) et 8 hommes (53,3%), d'âge moyen 53 ans (extrêmes de 31 à 71 ans).

4.1 Résultats cliniques et biologiques

Les résultats cliniques et biologiques sont résumés dans le tableau 3.

Quatorze des quinze patients atteints de NAFLD étaient asymptomatiques. Un seul présentait des signes d'hypertension portale débutante. Chez les onze patients asymptomatiques, la biopsie hépatique était motivée par des perturbations inexpliquées des tests hépatiques découvertes au cours du bilan d'une autre pathologie. Il s'agissait d'une dyslipidémie dans 5 cas, de douleurs articulaires dans 4 et d'un diabète dans 1. La découverte était totalement fortuite chez un patient. Un autre a subi une ponction-biopsie hépatique pour un nodule hépatique découvert dans le bilan d'un anévrisme de l'aorte. Pour 3, une biopsie chirurgicale a été réalisée au cours du traitement chirurgical d'une obésité morbide.

Le bilan hépatique était perturbé chez douze patients (80%) : tous présentaient une élévation des transaminases, avec un rapport ASAT/ALAT < 1 chez dix patients. Il s'y associait une augmentation de

Résultats

l'activité des γ GT chez dix malades (66,6%) et de l'activité des phosphatases alcalines chez trois (25%). Sept patients (58,3%) présentaient une élévation isolée, discrète ou modérée, de la ferritinémie. La recherche des mutations C282Y et H63D du gène HFE était négative lorsqu'elle était effectuée.

Résultats

Tableau 3 : résultats cliniques et biologiques, patients n°1 à 8

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8
Age	52	53	65	44	69	57	42	31
Sexe	F	F	M	F	M	M	M	M
ASAT	57	31	31	83	284	26	43	↑
ALAT	15	61	50	118	642	44	112	↑
ASAT/ALAT	3,8	0,50	0,62	0,7	0,44	0,59	0,38	-
γGT	329	437	-	118	305	266	835	↑
PAL	166	154	-	95	97	102	79	-
Bilirubine totale	-	19	-	9	27	7	16	-
Fer	24	14	-	5	23	19,9	21	-
Ferritine	250	217	-	40	788	224	283	-
Transferrine	2,56	2,86	-	2,81	N	2,25	2,53	-
CFT	64	72	-	70	N	56	63	-
CSF	38	19	-	7	38	31	33	-
Gène HFE	N	-	-	-	-	N	-	-
Cholesterol total	5,88	7,09	-	6,16	7,81	5,6	6,6	N
						Tahor		
TG	5,18	0,9	-	1,64	1,21	1,65	2,49	N
Acide urique	312	-	-	267	-	399	417	-
Sérologies virales	nég	nég	-	nég	nég	nég	nég	nég
Auto-ac	nég	nég	-	nég	nég	nég	nég	nég
Bilan thyroïdien		N		N	N	N	N	
Prise d'alcool	0	0	20	20	0	20	0	0
g/j								
Poids (kg)	57	88	89	82	58	66	80	76
Taille (m)	1,61	1,58	1,76	1,64	1,6	1,66	1,7	1,76
BMI	22	35,3	28,7	30,5	22,7	24	27,7	24,5
HTA/DNID	-	-	-/+	-	-	-	-	-

Abréviations : ASAT, activité aspartate aminotransférase ; ALAT, alanine aminotransférase ; γGT, gamma-glutamyltranspeptidase ; PAL, phosphatase alcaline ; CFT, capacité de fixation de la transferrine ; CSF, coefficient de saturation du fer ; BMI, indice de masse corporelle ; HTA, hypertension artérielle ; DNID, diabète non-insulinodépendant ; Tahor, médicament hypocholesterolémiant ; hypo, hypothyroïdie ; nég, négatif. Valeurs normales : ASAT, ALAT<31UI/l, γGT<32UI/l, PAL<141UI/l, Bilirubine totale<17μmol/l, Fer : 13-25μmol/l, Ferritinémie : 30-300μg/l (homme), 20-150μg/l (femme) , Transferrine : 1,79-2,87g/l, CFT : 42-72μmol/l, CSF : 20-40%, Cholesterol total<6,2mmol/l, Triglycérides<1,7mmol/l, Acide urique<420μmol/l.

Tableau 3 : résultats cliniques et biologiques, patients n°9 à 15

Patients	9	10	11	12	13	14	15
Age	56	62	71	54	40	35	64
Sexe	M	M	F	M	F	F	F
ASAT	↑	51	29	23	16	N	-
ALAT	-	67	38	46	25	N	-
ASAT/ALAT	-	0,76	0,76	0,5	0,64	-	-
γGT	↑	258	352	40	27	N	-
PAL	-	157	145	67	74	N	-
Bilirubine totale	-	12	14	15	7	N	-
Fer	-	22	17	19	-	N	-
Ferritine	↑	313	260	664	-	N	-
Transferrine	-	3,18	2,04	2,23	-	N	-
CFT	-	80	51	56	-	N	-
CSF	-	28	33	34	-	N	-
Gène HFE	-	-	-	N	-	-	-
Cholesterol total	↑	4,64	4,16	6,84	6,2	N	↑
TG	-	1,89	1,33	0,97	2,6	N	-

Résultats

Acide urique	-	N	236	311	299	N	291
Sérologies virales	-	nég	HBc+	nég		nég	-
Auto-ac	-	+	nég	nég		N	-
Bilan thyroïdien	-	+	N	N		N	Hypo traitée
Prise d'alcool	0	0	0	20	0	0	0
g/j							
Poids (kg)	79	80	92	88	107	150	140
Taille (m)	1,7	1,76	1,65	1,7	1,71	1,76	1,66
BMI	27,3	25,8	33,8	30,4	36,6	48,4	50,8
HTA/DNID	-	+/+	-/+	-	-	-	+/+

Abréviations : ASAT, activité aspartate aminotransférase ; ALAT, alanine aminotransférase ; gGT, gamma-glutamyltranspeptidase ; PAL, phosphatase alcaline ; CFT, capacité de fixation de la transferrine ; CSF, coefficient de saturation du fer ; BMI, indice de masse corporelle ; HTA, hypertension artérielle ; DNID, diabète non-insulinodépendant ; Tahor, médicament hypocholestérolémiant ; hypo, hypothyroïdie ; nég, négatif. Valeurs normales : ASAT, ALAT<31UI/l, γ GT<32UI/l, PAL<141UI/l, Bilirubine totale<17 μ mol/l, Fer : 13-25 μ mol/l, Ferritinémie : 30-300 μ g/l (homme), 20-150 μ g/l (femme) ; Transferrine : 1,79-2,87g/l, CFT : 42-72 μ mol/l, CSF : 20-40%, Cholesterol total<6,2mmol/l, Triglycérides<1,7mmol/l, Acide urique<420 μ mol/l.

4.2 Résultats métaboliques

Les quinze patients atteints de NAFLD présentaient une ou plusieurs atteintes métaboliques.

Treize patients (83,3%) présentaient une surcharge pondérale avec un indice de masse corporelle moyen à 32,6 kg/m² (extrêmes de 24 à 50,8 kg/m²). Parmi eux, sept (46,6%) étaient considérés comme obèses car leur indice de masse corporelle était supérieur à 29,5 kg/m².

Quatre patients (26,6%) présentaient un diabète non-insulinodépendant, deux (13,3%) une hypertension artérielle systolique traitée. Huit patients (66,6%) avaient une dyslipidémie : il s'agissait d'une hypercholestérolémie dans 5 cas (33,3%), une étant équilibrée sous traitement, d'une hypertriglycéridémie dans 2 (13,3%) et d'une dyslipidémie mixte dans deux (13,3%).

Un patient (6,6%) présentait des auto-anticorps détectables dans le sérum. Il s'agissait d'auto-anticorps anti-péroxydase et anti-estomac. Ce patient était suivi pour une maladie de Basedow compliquée d'une thyroïdite d'Hashimoto. Un patient avait une polyarthrite rhumatoïde séronégative.

Treize patients (86,6%) avaient des sérologies virales B et C négatives. Deux patients (13,3%) avaient des anticorps anti-HBc positifs. Ces patients avaient présenté une hépatite aigüe liée au virus B considérée comme guérie.

4.3 Résultats histologiques

Les lésions histologiques observées dans la NAFLD sont représentées par la planche 1.

Tous les patients (58,3%) présentaient une stéatose Elle était mineure dans 6 cas (40%), modérée dans 5 (33,3%) et majeure dans 4 (26,6%). La stéatose était à prédominance macrovacolaire sauf dans un cas où elle était à prédominance microvacolaire.

La stéatose était associée à un infiltrat inflammatoire lobulaire dans 12 cas (80%). Cet infiltrat était discret et fait d'une prédominance de cellules mononucléées dans 7 cas (46,6%). Dans 4 cas (26,6%), l'infiltrat était modéré et plus polymorphe. Son intensité était plus marquée dans un seul cas (6,6%) avec d'assez nombreux polynucléaires.

La nécrose de ballonnisation n'était observée que dans 3 cas (20%). Elle était associée à un infiltrat inflammatoire lobulaire modéré dans 2 cas et marqué dans un. Dans 2 cas (13,3%), des corps

de Mallory étaient notés. Dans tous les cas, leur présence était associée à la nécrose de ballonnisation.

Des noyaux glycogéniques étaient observés dans 6 cas (40%), des lipogranulomes dans 5 (33,3%).

La présence d'une fibrose péri-sinusoïdale était notée dans 9 cas (60%). Elle était associée à une fibrose portale extensive dans 4 cas (26,6%), à une fibrose avec de nombreux septa dans 1 (6,6%) et à une cirrhose dans 2 (13,3%).

Un infiltrat inflammatoire portal, mononucléé était observé dans 10 cas (66,6%). Il était d'intensité légère dans 8 et modérée dans 2. L'infiltrat portal était associé dans tous les cas à la présence d'un infiltrat lobulaire. Une prolifération de néoductules biliaires était notée dans 4 cas (26,6%) dont les 2 cas de cirrhose.

Une surcharge en fer hépatocytaire et/ou kupfférienne était observée dans dix cas (66,6%). La moyenne du score histologique du fer selon la classification de Deugnier en 60 points était de 9,6 (extrêmes de 3 à 18).

4.4 Résultats immunohistochimiques

Les résultats immunohistochimiques sont représentés par les planches 2 et 3.

4.4.1 foie normal

L'anticorps anti-CD68 marquait le cytoplasme des cellules de Kupffer situées au sein du lobule hépatique et celui des macrophages dans les espaces portes. Ces cellules étaient peu nombreuses et dispersées.

Quelques cellules marquées par l'anticorps anti-CD68 étaient également marquées par l'anticorps anti-myélopéroxydase.

L'anticorps anti-actine musculaire lisse ne mettait en évidence aucune cellule stellaire activée du foie dans le lobule hépatique. La paroi de la branche de l'artère hépatique dans l'espace porte présentait un marquage intense et servait de témoin interne positif.

Le marquage par l'anticorps anti-mitochondries était intra-cytoplasmique et granulaire. Tous les hépatocytes présentaient ce marquage avec une forte intensité. Les cellules bordant les canaux biliaires étaient également marquées.

L'anticorps anti-nitrotyrosine présentait un marquage discret sous la forme de petits grains intra-cytoplasmiques. Ce marquage était observé dans de rares hépatocytes.

4.4.2 NAFLD

Les cellules de Kupffer et les macrophages des espaces portes marqués par l'anticorps anti-CD68 étaient en nombre variable selon les biopsies. Dans 3 cas, la proportion de cellules marquées étaient similaires aux biopsies hépatiques servant de contrôle. Ces cellules étaient en nombre modéré dans 8 cas. Elles étaient très nombreuses dans 4 cas.

Le marquage observé avec l'anticorps anti-myélopéroxydase dans les 15 cas était similaire à celui observé dans les biopsies de contrôle. Ce marquage était représenté par quelques cellules dispersées.

Dans 5 cas, l'anticorps anti-musculaire lisse mettait en évidence la présence de cellules stellaires du foie au sein des sinusoides. Ce marquage prédominait dans la zone 3. Dans les autres cas, le marquage

était négatif comme pour le foie normal.

Nous avons établi une grille semi-quantitative (cf. tableau 4) nous permettant d'évaluer le "grading" de l'activité de la NAFLD. Pour cela nous avons pris en compte 3 critères histologiques et 2 critères immunohistochimiques. Les critères histologiques sont 1) l'infiltrat inflammatoire lobulaire dont l'intensité est gradé de 0 à 3, 2) la nécrose présente (= 0) ou absente (= 2), 3) la fibrose périsinusoidale présente (= 0) ou absente (= 1). Les critères immunohistochimiques sont 1) l'intensité du marquage par l'anticorps anti-CD68 gradé de 1 à 3 et 2) la présence (= 1) ou non (=0) de cellules marquées par l'anticorps anti-actine musculaire lisse.

Un score $>$ à 3 établissait le diagnostic de stéatohépatite. En effet, nous admettions 1) un point pour l'infiltrat lobulaire qui est souvent minime mais présent au cours d'une stéatose, 2) un point pour le marquage avec l'anticorps anti-CD68 du fait de l'association fréquente d'une réaction macrophagique à la stéatose par éclatement des vacuoles, et 3) un point du fait de la discordance qu'il existe dans quelques cas entre la fibrose périsinusoidale et le marquage par l'anticorps anti-actine musculaire lisse.

De ce fait nous observons 6 cas de stéatose et 9 cas de stéatohépatite.

Le nombre d'hépatocytes marqués par l'anticorps anti-mitochondries est diminué dans tous les cas. La diminution du marquage prédomine le plus souvent dans les zones centro-lobulaires.

Le parenchyme hépatique est marqué de façon diffuse par l'anticorps anti-nitrotyrosine. Ce marquage est d'intensité légère dans 4 cas de stéatose et dans 4 cas de stéatohépatite. Il est d'intensité modéré dans 2 cas de stéatose et dans 5 cas de stéatohépatite.

Tableau 4: Résultats histologiques et immunohistochimiques

Patient	lobulaire	Infiltrat	Nécrose	FPS	CD68	AML	score	SHF	Fibrose	NTY	113-1
1	1	1	0	1	2	1	5 (SH)	6	1	1	↓
2	0	0	0	0	3	0	3 (S)	3	0	1	↓
3	1	1	0	0	2	0	2 (S)	6	1	1	↓
4	1	1	0	1	2	0	4 (SH)	0	1	2	↓
5	1	1	0	1	3	1	6 (SH)	6	1	1	↓
6	0	0	0	0	2	0	2 (S)	0	0	1	↓
7	1	1	0	0	2	0	3 (S)	12	0	2	↓
8	1	1	0	0	1	0	1 (S)	0	0	1	↓
9	1	1	0	0	2	0	3 (S)	18	0	2	↓
10	2	2	2	1	1	0	6 (SH)	12	4	1	↓
11	2	2	2	1	1	0	6 (SH)	6	4	1	↓
12	1	1	0	1	2	0	4 (SH)	18	1	2	↓
13	3	3	2	1	2	1	9 (SH)	0	1	2	↓
14	2	2	2	1	3	1	9 (SH)	0	1	2	↓
15	3	3	2	1	3	1	10 (SH)	0	2	2	↓

Abréviations: FPS, fibrose périnusoidale; AML, actine musculaire lisse; SHF, score histologique du fer(Deugnier); NTY, nitrotyrosine; SH, stéatohépatite; S, stéatose

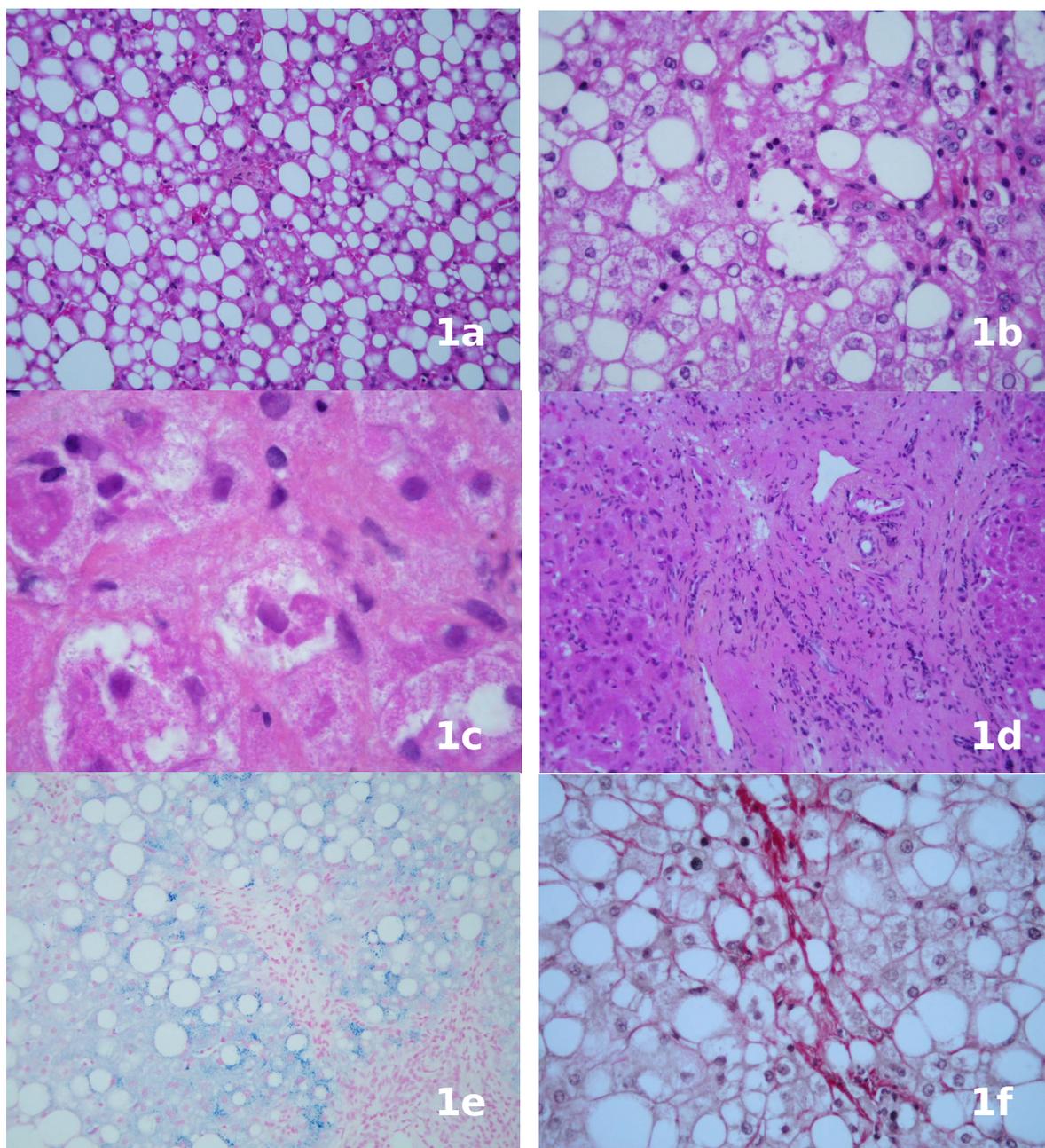


Planche 1 - Lésions histologiques de la NAFLD

1a : Stéatose macrovacuolaire panlobulaire. HES (X20).

1b : Stéatohépatite avec infiltrat inflammatoire lobulaire et nécrose de ballonisation. A noter, la présence de noyaux glycogéniques. HES (X40).

1c : Stéatohépatite avec corps de Mallory. HES (X100).

1d : Stéatohépatite au stade de cirrhose. HES (X20).

1e : Stéatohépatite avec surcharge ferrique intrahépatocytaire. Perls (X20).

1f : Stéatohépatite avec fibrose périsinusoïdale. Picosirius (X40).

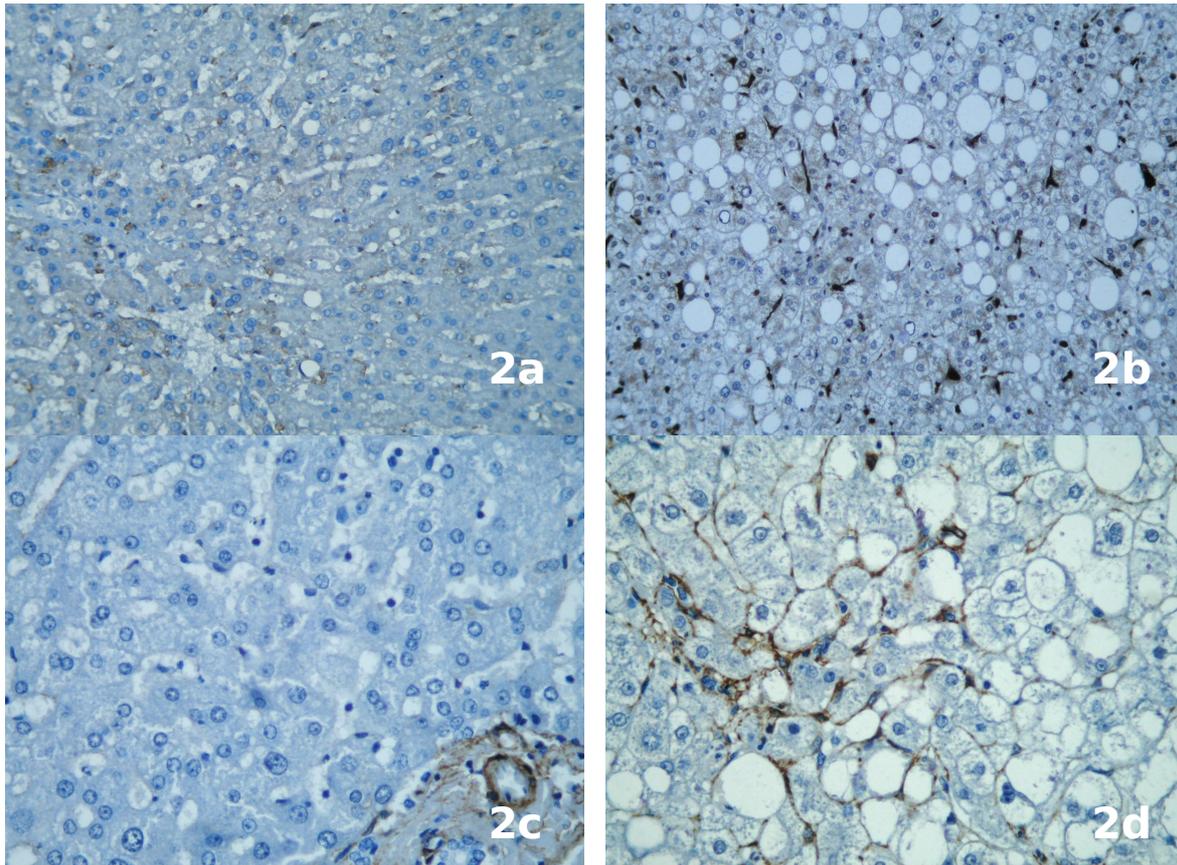


Planche 2 – Immunomarquage foie normal (2a et 2c) / NAFLD (2b et 2d)

2a et 2b - Anticorps anti-CD68 : augmentation du nombre de cellules de Kupffer et de macrophages exprimant le CD68 dans la NAFLD (2b) en comparaison avec le foie normal (2a). (X20).

2c et 2d – Anticorps anti-actine musculaire lisse : augmentation du nombre de cellules stellaires activées exprimant l'actine musculaire lisse dans la NAFLD (2d) en comparaison avec le foie normal (2c). (2c X20), (2d X40).

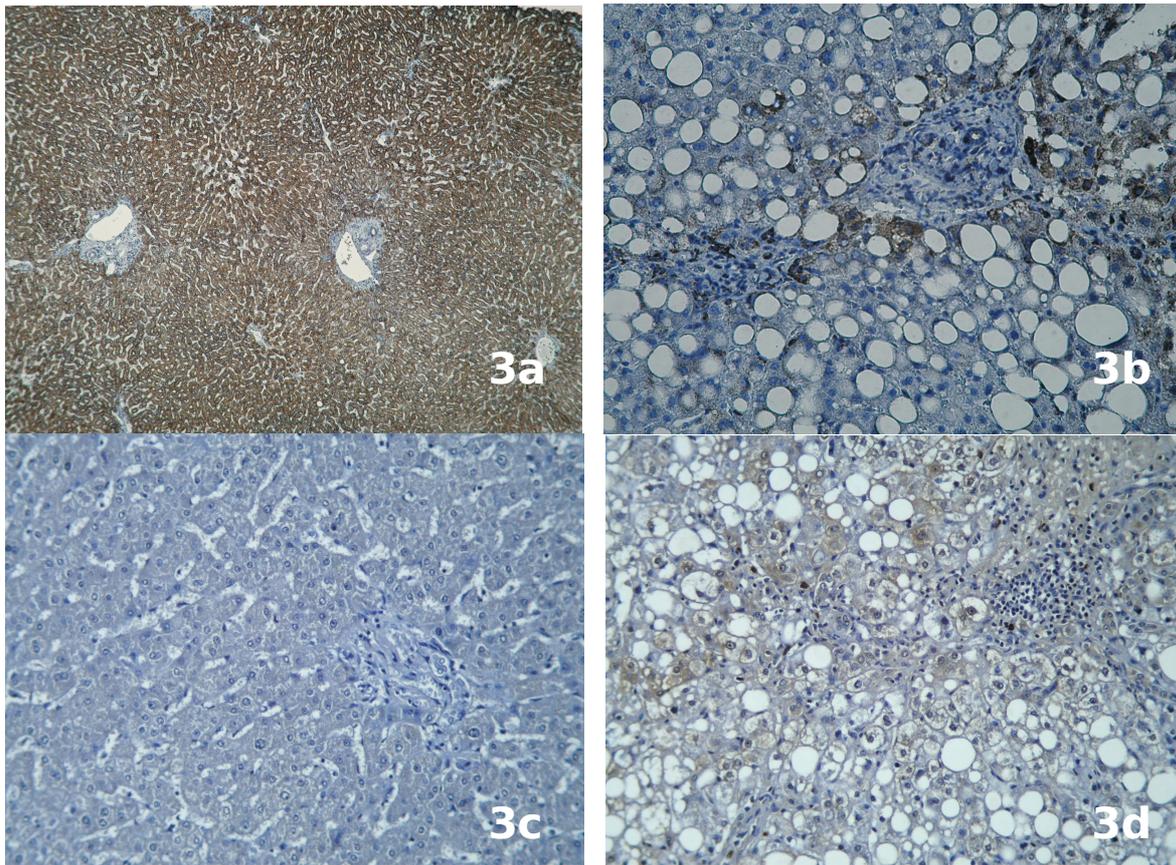


Planche 3 - Immunomarquage foie normal (3a et 3c) / NAFLD (3b et 3d)

3a et 3b – Anticorps anti-mitochondrie 113-1 :

marquage cytoplasmique intense de tous les hépatocytes du foie normal par 113-1. (3a, X5).

Perte d'expression de 113-1 par les hépatocytes centrolobulaires dans la NAFLD. (3b, X20).

3c et 3d – Anticorps anti-nitrotyrosine : augmentation du marquage intra-cytoplasmique dans la NAFLD en comparaison avec le foie normal. (X20)

5. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à établir les corrélations existant à l'échelle morphologique entre 1) l'activité de la NAFLD, 2) les anomalies des mitochondries, et 3) la nitration. La première difficulté de ce travail a été de définir quels étaient les critères d'activité de la maladie et ceux qui permettaient d'apprécier leur intensité. C'est ce qui nous a amenés à nous intéresser, outre aux critères histologiques déjà répertoriés, à deux marqueurs des cellules inflammatoires, le CD68 et la myéloperoxydase, et à un marqueur des cellules stellaires hépatiques, l'actine musculaire lisse. L'utilisation de ces marqueurs nous a permis d'affiner l'appréciation de l'activité nécrotico-inflammatoire de la NAFLD. Cette étude montre aussi l'existence d'anomalies mitochondriales et l'augmentation de la nitration aussi bien dans la stéatose que dans la stéatohépatite de la NAFLD. La nitration semble augmenter de façon parallèle à l'augmentation de trois paramètres de la NAFLD: l'activité nécrotico-inflammatoire, et en particulier le nombre de cellules positives avec l'anticorps anti-CD68, la fibrose centrolobulaire débutant par l'activation des cellules stellaires et la surcharge ferrique.

La stéatose et la SHNA, ont été regroupées sous l'acronyme NAFLD. En effet, "non alcoholic fatty liver disease" est le terme choisi pour parler du syndrome anatomo-clinique qui inclut à ses deux extrémités la stéatose et la SHNA. Les critères significatifs de diagnostic et de pronostic, répartis en grade et en stade, de la NAFLD partagent les opinions. L'activité est gradée habituellement en fonction de l'intensité de la stéatose et de l'activité nécrotico-inflammatoire. L'extension de la fibrose ou "stade" inclut la fibrose périsinusoïdale centrolobulaire typique de la SHNA, la fibrose périportale et la cirrhose. L'activité nécrotico-inflammatoire de la NAFLD est fonction de l'infiltrat inflammatoire lobulaire et de la nécrose de ballonnisation avec ou sans corps de Mallory. L'infiltrat inflammatoire lobulaire est généralement décrit comme mixte, constitué de polynucléaires neutrophiles et de cellules mononucléées. L'anticorps anti-CD68 marque les cellules de Kupffer et les macrophages. Dans notre étude, nous avons observé des variations importantes du nombre de cellules exprimant le CD68 entre les différents cas de NAFLD et par comparaison au foie normal. Ce marquage permettait donc d'apprécier au mieux l'infiltrat monocytaire associé à la NAFLD. Par contre, l'étude du marquage par l'anticorps anti-myéloperoxydase, autre marqueur des cellules inflammatoires (polynucléaires, macrophages et cellules de Kupffer), n'a pas montré de différence significative dans l'analyse des biopsies hépatiques incluant des foies normaux. Cette étude immunohistochimique des populations des cellules inflammatoires confirme le rôle primordial des monocytes-macrophages dans l'infiltrat associé aux NAFLD. Il nous a permis d'affiner notre "grading" de ces pathologies. L'activité nécrotico-inflammatoire est aussi fonction de la nécrose hépatocytaire. Il s'agit d'une nécrose de ballonnisation avec ou sans corps de Mallory. Cette nécrose est souvent entourée de cellules inflammatoires.

Dans les différentes classifications de valeur pronostique des NAFLD, la stéatose est un critère noté à tous les grades de la maladie. Elle ne paraît donc pas être un véritable critère pronostique. Par contre, l'activation des cellules stellaires hépatiques pourrait constituer un critère supplémentaire de valeur pronostique. Ces cellules sont en effet, impliquées dans la fibrogénèse. L'expression du gène du collagène de type I serait augmentée dans ces cellules par le 4'-hydroxynonanal, produit de la peroxydation lipidique. De ce fait, et sous l'effet de différentes cytokines, elles subissent un changement phénotypique et acquièrent celui des cellules myofibroblastiques puis fibroblastiques. Les cellules myofibroblastiques contenant des microfilaments d'actine peuvent être mise en évidence par l'anticorps anti-actine musculaire lisse. Dans notre série, aucun des 6 cas de stéatoses n'exprimait l'actine musculaire lisse alors que 5 des 9 (55,5%) stéatohépatites l'exprimaient. Dans 2 autres cas de stéatohépatites, l'absence d'expression pouvait s'expliquer par la présence d'une cirrhose et donc un phénotype fibroblastique des cellules stellaires. L'activation des cellules stellaires apparaît bien par conséquent comme un critère diagnostique des stéatohépatites, de valeur pronostique.

En résumé, nous avons intégré dans l'activité nécrotico-inflammatoire de la NAFLD, en plus des critères histologiques "classiques", des critères immunohistochimiques, comme les cellules inflammatoires mononucléées exprimant le CD68 et les cellules stellaires activées exprimant l'actine musculaire lisse.

Dans notre travail, 15 cas de NAFLD ont été étudiés. Ces cas pourraient être histologiquement

subdivisés en 4 groupes : 1) stéatose pure (1 cas, 6,66%), 2) stéatose avec surcharge ferrique (5 cas, 33,3%), 3) stéatohépatite pure (5 cas, 33,3%) et 4) stéatohépatite avec surcharge ferrique (4 cas, 26,6%) dont 2 au stade de cirrhose. Il ressort que dans plus de la moitié des cas de NAFLD (60%), il existe une surcharge ferrique. Celle-ci était associée dans 6 cas (20%) à une augmentation isolée de la ferritinémie. Il semble donc difficile de négliger l'impact des troubles du métabolisme du fer dans l'évolution de la NAFLD. Cette constatation a déjà été faite par certains auteurs qui ont décrit le syndrome d'hépatosidérose dysmétabolique comme faisant partie du spectre de la NAFLD. L'analyse des critères diagnostiques de l'hépatosidérose dysmétabolique fait apparaître une grande similitude avec la NAFLD. En effet, l'hépatosidérose dysmétabolique est définie : 1) par une surcharge hépatique en fer modérée et mixte se traduisant biologiquement par une hyperferritinémie isolée, 2) par un ou plusieurs symptômes du syndrome d'insulinorésistance et 3) par l'absence d'une cause connue de surcharge en fer. De plus, l'hépatosidérose dysmétabolique est associée à une stéatose dans 60% des cas, à une stéatohépatite dans 25% des cas et à une fibrose pouvant aller jusqu'à la cirrhose dans 12% des cas.

Cette étude préliminaire des paramètres d'activité de la NAFLD nous a permis d'isoler plusieurs points d'ancrage du rôle des mitochondries et du stress oxydatif dans la physiopathologie de ce syndrome dysmétabolique: l'activité nécrotico-inflammatoire caractérisée par l'augmentation nette du nombre de cellules marquées par l'anticorps anti-CD68, la fibrogénèse traduite par l'activation des cellules stellaires et la surcharge ferrique intra-hépatocytaire.

Notre étude met en évidence une diminution nette du marquage obtenu avec l'anticorps anti-mitochondries dans les NAFLD. Les hépatocytes sont des cellules riches en mitochondries et sont donc fortement marqués par l'anticorps anti-mitochondries à l'état normal. Dans notre série, nous avons observé dans tous les cas une diminution d'intensité variable de ce marquage. Il était plus intense dans les stéatoses et les stéatohépatites que dans les SHNA au stade de cirrhose. Cette diminution d'expression de l'anticorps anti-mitochondries a une prédominance centrolobulaire. Cette distribution topographique du marquage correspond à la distribution des lésions histologiques d'activité de la SHNA. Par conséquent, il est vraisemblable qu'il existe un rapport entre la diminution du marquage dans la région centrolobulaire et la prédominance centrolobulaire des lésions de la NAFLD. La diminution du marquage par l'anticorps anti-mitochondries pourrait être due à une diminution du nombre de mitochondrie ce qui pourrait s'expliquer par la physiologie hépatique. Selon le schéma des zones de Rappaport qui modélise la vascularisation hépatique, l'apport en oxygène et en nutriments diminue progressivement de la zone 1 à la zone 3. Cet appauvrissement de la nutrition des hépatocytes va de pair avec la diminution de l'équipement enzymatique entre les zones 1 et 3. Les hépatocytes de la zone 3, centrolobulaire, sont ainsi plus sensibles aux variations d'apports nutritifs comme la diminution en oxygène et l'augmentation du catabolisme des lipides et des glucides. Ce mécanisme physiopathologique est souvent défendu dans la maladie alcoolique du foie où les lésions histologiques sont similaires à celles observées dans les SHNA. La diminution d'expression de cet anticorps anti-mitochondrie traduit-elle réellement une perte en mitochondrie ou plus simplement un dysfonctionnement?

L'anticorps que nous avons utilisé pour cette étude est dirigé contre l'antigène 113-1. Sa spécificité a été caractérisée par Papotti et al. qui a démontré son expression mitochondriale exclusive en immuno-électronique. Les structures mitochondriales marquées ne sont pas précisées et les photographies de cet article ne sont pas explicites. En pathologie hépatique, une seule étude a utilisé cet anticorps 113-1. Le but de cette étude était de mettre en évidence les mégamitochondries dans la maladie alcoolique du foie et de les distinguer des globules hyalins associés aux déficits en α 1-antitrypsine parfois dépistés dans ces pathologies. Cependant, même si l'on sait que 113-1 est spécifique de la mitochondrie, sa structure et sa fonction ne sont pas connues. La seule donnée dont nous disposons est que l'anticorps utilisé est dirigé contre une protéine non glycosylée de 60 kDa dont nous ne savons pas si elle est codée par l'ADN nucléaire ou mitochondrial. Cependant 1) cette protéine a un poids moléculaire proche de celui de la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COx), complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale, 2) elle présente une perte d'expression dans tous nos cas de NAFLD alors que parallèlement une diminution de l'activité de la COx a été démontrée dans la NAFLD. La perte d'expression de 113-1 observée dans notre étude pourrait par conséquent traduire la perte d'activité

enzymatique de la COx, protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale. La cytochrome oxydase est un complexe enzymatique dont les sous-unités 1 à 3 sont codées par l'ADN mitochondrial. Du fait de l'absence de protection par des histones, de l'absence de système de réparation et de la proximité de la source des ROS, l'ADNmt est plus sensible aux mutations que l'ADN nucléaire. Lorsque 80% de l'ADNmt d'une cellule est muté, une perte fonctionnelle de l'activité de la chaîne respiratoire peut s'observer. Si l'on émet l'hypothèse que la protéine 113-1 est une protéine codée par l'ADN mitochondrial, la diminution d'expression de 113-1 pourrait être secondaire à des mutations de cet ADN. Cette hypothèse peut être étayée par 1) la mise en évidence d'anomalies du génome mitochondrial dans la maladie alcoolique du foie qui présente des similitudes histologiques avec la NAFLD, 2) la présence d'anomalies mitochondriales déjà mises en évidence dans la NAFLD: a) la présence d'inclusions cristallines associées à un défaut du transfert des électrons de la chaîne respiratoire, b) une diminution du taux d'ATP hépatocytaire, c) une baisse de l'activité des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, en particulier de la cytochrome oxydase (complexe IV) dans une série de 43 patients atteints de SHNA.

Dans notre étude, nous observons que la perte d'expression de 113-1 va de pair avec une augmentation du stress oxydatif, représentée par une augmentation de la nitration des résidus tyrosines des protéines. Les nitrations des résidus tyrosines des protéines sont des modifications post-traductionnelles. En effet, ces nitrations sont secondaires à la fixation d'un groupement nitré NO_2^+ dans le cycle aromatique des tyrosines. Ce groupement NO_2^+ est transmis par le dioxyde nitrogène (NO_2°) formé à partir du NO° au cours de ses interactions avec l'oxygène et l'anion superoxyde (O_2^-). L'anticorps anti-nitrotyrosine permet, grâce à une technique simple d'immunohistochimie, la mise en évidence morphologique de ces modifications post-traductionnelles. La spécificité du marquage a été contrôlée en utilisant une solution de 3-nitrotyrosine neutralisant l'anticorps. Nous avons constaté par rapport au foie normal une augmentation du marquage avec l'anticorps anti-nitrotyrosine et par conséquent du stress oxydatif. Cette augmentation est observée au stade de stéatose et au stade de stéatohépatite. En effet, dans 2 cas de stéatoses sur 6 (33,3%) et dans 5 cas de stéatohépatites sur 9 (55,5%), le marquage par l'anticorps anti-nitrotyrosine était intense. Si l'on considère que le stress oxydatif est délétère et source d'évolutivité de la NAFLD, notre observation va à l'encontre du schéma classique proposé par Day et James et contre la classification de Brunt et al.. En effet pour Day et James, la première phase est représentée par l'accumulation d'acides gras responsable de la stéatose. Ce n'est que dans la deuxième phase qu'intervient le stress oxydatif, responsable de l'évolutivité de la NAFLD. Dans la classification de Brunt et al., la stéatose n'est considérée comme critère d'activité qu'en association avec l'activité nécrotico-inflammatoire. Des résultats rapportés par d'autres articles, utilisant d'autres marqueurs du stress oxydatif confortent nos observations. La présence de 8-hydroxydéoxyguanosine, une base de l'ADN modifiée par les ROS, a été mise en évidence dans les stéatoses et les stéatohépatites de la NAFLD. Il s'y associait une atteinte des membranes cellulaires caractérisée par la présence de 4-hydroxynonénal, métabolite majeur de la peroxydation lipidique. Il paraît donc un peu réducteur de séparer en seulement 2 phases l'évolutivité de la NAFLD. D'autant plus que d'autres facteurs doivent être pris en compte dans cette évolutivité. En effet si nous observons la présence de nitration dès le stade de stéatose, celle-ci s'accompagne d'une surcharge ferrique dans 5 des 6 cas de stéatoses. Il est alors intéressant de noter que 1) le fer des protéines héminiques comme la guanylate cyclase interagit avec le monoxyde d'azote dans la signalisation cellulaire et 2) la présence de fer augmente le stress oxydatif de par ses interactions avec le peroxy-nitrite et le monoxyde d'azote. La présence du fer semble donc avoir un rôle non négligeable dans la pathogénie de la NAFLD.

Un autre point a également attiré notre attention. L'augmentation de la nitration s'accompagne, dans 5 des 9 cas de stéatohépatites présentant une fibrose, d'une activation des cellules stellaires hépatiques mise en évidence par l'expression de l'actine musculaire lisse. Cette observation renforce notre hypothèse quant à la pertinence de l'actine musculaire lisse comme marqueur précoce de la fibrogénèse. Le stress oxydatif pourrait jouer un rôle dans la constitution de la fibrose. En effet, le 4'-hydroxynonénal, produit de la peroxydation lipidique et autre marqueur du stress oxydatif serait impliqué dans l'activation des cellules stellaires hépatiques en augmentant l'expression du gène du collagène I.

Discussion

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude montre, qu'avec une technique simple d'immunohistochimie, il est possible de mettre en évidence le processus biochimique complexe de la nitration dans la pathologie dysmétabolique du foie. Nous avons constaté que la survenue du stress oxydatif dans la NAFLD est plus précoce que ce qui est suggéré dans la littérature. En effet, la nitration des résidus tyrosine des protéines est observée dès le stade de stéatose.

De plus cette nitration semble associée, dans le cadre de la NAFLD, à une diminution de la fonction mitochondriale, à l'apparition d'une population cellulaire inflammatoire mononucléée, à l'activation des cellules stellaires hépatiques et à la surcharge ferrique.

Si nous avons observé une diminution du marquage par l'anticorps anti-mitochondries, sa nature exacte reste à préciser. Compte tenu des hypothèses émises à ce sujet dans ce travail, une étude de la relation de l'antigène 113-1 avec les sous-unités de la cytochrome oxydase, enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, est à envisager. Ceci d'autant plus que nous connaissons le rôle d'un dysfonctionnement de cette fonction respiratoire dans la survenue du stress oxydatif.

7. BIBLIOGRAPHIE

NOM : BLANCHOT-JOSSIC

PRENOM : Frédérique

Titre de la Thèse:

ROLE DES MITOCHONDRIES DANS LES STEATOSES ET STEATOHEPATITES NON ALCOOLIQUES.

RESUME:

Le syndrome anatomo-clinique dysmétabolique désigné par l'acronyme anglo-saxon NAFLD pour " Non Alcoholic Fatty Liver Disease" inclut les lésions de stéatose et de stéatohépatite non alcoolique (SHNA). La complication majeure de la NAFLD est la cirrhose. La pathogénie de la NAFLD est mal connue. L'hypothèse d'une évolution en 2 phases a été proposée avec une première phase de surcharge et une deuxième phase liée au stress oxydatif responsable de l'activité nécrotico-inflammatoire. La mitochondrie joue un rôle important dans ces 2 phases.

Le but de ce travail était de comparer *in situ* les variations d'expression des mitochondries et du stress oxydatif, par une technique d'immunohistochimie, avec l'activité nécrotico-inflammatoires et l'extension de la fibrose des NAFLD.

Entre octobre 2002 et novembre 2003, 15 patients atteints de NAFLD ont été inclus. Les données cliniques et biologiques étaient colligées. Les biopsies hépatiques de ces patients ont été examinées après colorations standards et immunohistochimiques. Les anticorps utilisés étaient dirigés contre les macrophages et les cellules de Kupffer (CD68 et myeloperoxydase), contre les cellules stellaires activées (actine musculaire lisse), contre une protéine mitochondriale (113-1) et contre les nitrotyrosines. Une évaluation de l'activité nécrotico-inflammatoire et de la fibrose a été réalisée. L'intensité de ces lésions a été comparée aux résultats obtenus avec les différents anticorps.

Parmi les 15 patients, 1 présentait une stéatose, 5 une stéatose associée à une surcharge ferrique, 5 une stéatohépatite et 4 une stéatohépatite associée à une surcharge ferrique. Les cellules marquées par le CD68 et l'actine musculaire lisse étaient significativement augmentées par rapport au foie normal. Dans tous les cas, il était observé une diminution de l'expression de 113-1 de distribution centrolobulaire et une augmentation diffuse de la nitration.

Cette étude suggère, grâce à des outils morphologiques simples, la présence d'une nitration excessive dans la NAFLD dès le stade de stéatose. Elle est associée à une perte fonctionnelle mitochondriale et pourrait jouer un rôle dans l'évolution de la fibrose.

MOTS-CLES: Stéatose et stéatohépatite non alcooliques

NAFLD

Mitochondries

Nitration

Immunohistochimie