

Mémoire de Recherche Clinique

**Quantification digitale de la fibrose idiopathique de l'allogreffe
hépatique en pédiatrie et utilité pronostique de la quantification du
marqueur CK7 dans le développement de la fibrose.**

Nour RAHNAMA

Promoteur : Professeur E. SOKAL

UCL

**Université
catholique
de Louvain**



ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

Ce Mémoire de Recherche Clinique n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide précieuse des personnes qui m'ont aidée et suivie durant ces deux années.

Tout d'abord, mes sincères remerciements vont à mon promoteur le Professeur Sokal qui m'a suivie et soutenue tout au long de ce travail.

Je remercie également mon co-promoteur, le Docteur Sharat Varma, pour le temps qu'il m'a accordé dans ce projet et pour le suivi de mes travaux.

Mes remerciements également à Mme Caroline Bouzin qui m'a appris à utiliser le programme informatique Visiopharm afin d'obtenir les données de mon étude.

Enfin, je remercie le Professeur Smets, présidente de mon Jury, ainsi que les autres membres de mon Jury, qui prendront le temps de lire ce travail.

Table des matières

I.	Introduction	1
1.1.	Fibrose idiopathique de l'allogreffe.....	1
a.	Définition et épidémiologie	1
b.	Hypothèse étiologique	2
c.	Histoire naturelle et facteurs prédisposants	2
d.	Diagnostic.....	5
	d.1. Méthodes invasives : biopsies protocolaires	5
	d.2. Méthodes non-invasives	9
	d.3. Nouvelles méthodes en cours de recherche	11
e.	Facteurs prédictifs	12
1.2.	Objectifs de l'étude	14
II.	Matériel et méthodes.....	15
2.1.	Méthodes	15
2.2.	Patients	16
2.3.	Matériels	17
	a. <i>Fonctionnement du système de quantification digitale</i>	17
	b. <i>Méthodes statistiques</i>	19
III.	Résultats.....	20
IV.	Discussion	22
V.	Conclusion.....	24
VI.	Bibliographie	28

Liste des abréviations utilisées :

IPTH : Idopathic Post-Transplant Hepatitis

DSA : Donor Specific Antibodies

ANA : Antinuclear Antibodies (anticorps antinucléaires)

SMA : Smooth Muscle Antibodies (anticorps anti-muscle lisse)

LKM : Liver-Kidney Microsomal antibodies (anticorps anti-microsomes du foie et du rein ou anticorps anti-réticulum endoplasmique).

LAFTSc : Liver Allograft Fibrosis Scoring system

CPA : Collagen Proportionate Area

ASMA : Alpha-Smooth Muscle Actin

CK7 : Cytokeratin 7

CHS : Cellule hépatique stellaire

OBJECTIFS :

Evaluer le mécanisme de la fibrose idiopathique de la greffe à partir de biopsies analysées par un programme digital : comparer la méthode de quantification digitale de la fibrose avec les méthodes d'évaluation visuelle standards et évaluer l'utilité pronostique du marqueur CK7 dans la prédiction de la fibrose.

MATERIEL ET METHODES :

Analyse par les deux méthodes (digitale et visuelle) des biopsies d'une cohorte de 46 patients pédiatriques transplantés entre 2012 et 2014 et suivis dans le service d'hépatogastroentérologie pédiatrique des Cliniques Universitaires Saint-Luc, pour lesquels deux biopsies consécutives avaient été réalisées entre l'année 2014 et 2016. Toutes les biopsies ont été traitées au préalable au rouge Sirius et au marquage par CK7. L'analyse visuelle a été réalisée en anatomopathologie en utilisant les scores Metavir et LAFSc. L'analyse digitale fut réalisée à l'aide d'un logiciel informatique (Visiopharm version 6.0.0) permettant de calculer la quantité de fibrose, le résultat étant exprimé par le « CPA » (Collagen Proportionate Area). Les coefficients PCC (Polyserial Correlation Coefficients) et des modèles de régression logistique ordinaire ont été utilisés pour les calculs statistiques.

RESULTATS :

Corrélation élevée entre le système de scoring digital et le système de scoring visuel pour l'évaluation de la fibrose totale aussi bien pour la comparaison avec le Metavir (PCC = 0,857) qu'avec le LAFSc (PCC = 0,871). Bonne corrélation également entre les deux méthodes pour l'estimation de la variation prospective de la fibrose (PCC de 0,735 pour le Metavir et de 0,94 pour le LAFSc). Association statistiquement significative entre le pourcentage de surface CK7-positif et la sévérité de la réaction ductulaire (P-valeur = 0,006), de l'inflammation portale (P-valeur = 0,01) et de la fibrose au niveau de la même biopsie (Metavir : P-valeur = 0,02, LAFSc-total : P-valeur = 0,01).

Le pourcentage de surface CK7-positif calculé sur la biopsie de base n'a pas montré d'association statistiquement significative avec la variation prospective de la fibrose évaluée avec le score Metavir (P=0,36) et le score LAFSc (P= 0,25).

CONCLUSION :

1- La méthode de quantification digitale de la fibrose présente une très bonne concordance avec les méthodes d'évaluation standard et présente de nombreux avantages (observateur-indépendant, rapidité de traitement des données, contrôle de qualité des éventuelles sur/sous-estimations, précision des résultats par rapport à l'analyse visuelle, ...). Cet outil aurait donc potentiellement sa place en utilisation courante dans la pratique clinique, après démonstration par une étude ultérieure de sa supériorité en termes de reproductibilité des résultats.

2- Le marqueur CK7 ne prédit pas le développement futur de la fibrose. D'autres marqueurs spécifiques aux différentes composantes de la réaction ductulaire devraient être recherchés afin de faire la lumière sur le lien entre la réaction ductulaire et le développement de fibrose.

AIMS:

To assess the mechanism of idiopathic allograft fibrosis on digitally analyzed biopsies. The performance of a digital quantification method of fibrosis was compared to the performance of standard visual methods.

This study also assesses the prognostic value of the CK7 as a marker to predict development of fibrosis.

MATERIAL AND METHODS:

Biopsies from 46 pediatric patients were analysed by two methods (digital and visual). The cohort consisted of patients of the pediatric hepato-gastroenterology unit of the Saint-Luc University Clinics who were transplanted between 2012 and 2014. On each patient, two biopsies have been performed between 2014 and 2016.

All biopsies were pre-treated with Sirius red coloration and CK7 marker. Visual analysis was performed by anatomopathology using Metavir and LAFSc scores. The digital analysis was performed using computer software. Visiopharm version 6.0.0 was used to calculate the amount of fibrosis - the result being expressed by the "CPA" (Collagen Proportionate Area). Polyserial Correlation Coefficients (PCC) and ordinal logistic regression models were used for statistical analysis.

RESULTS:

The results of the digital and the visual scoring systems were highly correlated for the assessment of total fibrosis both for the comparison with Metavir (PCC = 0.857) and with LAFSc (PCC = 0.871). Good correlation was also observed between the two methods for the assessment of the prospective variation of fibrosis (0.735 PCC for Metavir and 0.94 for LAFSc).

Statistically significant correlation between CK7-positive surface percentage and ductular reaction severity (P-value = 0.006), portal inflammation (P-value = 0.01), and fibrosis at the same biopsy (Metavir: P-value = 0.02, LAFSc-total: P-value = 0.01).

The CK7-positive surface percentage calculated on the basic biopsy did not show a statistically significant association with the prospective variation of fibrosis evaluated with the Metavir score (P = 0.36) and the LAFSc score (P = 0.25).

CONCLUSION:

1- The digital quantification method of fibrosis has a very good agreement with standard evaluation methods and offer many advantages (observer-independent, faster data processing rate, verification of over/underestimates, higher accuracy of the results compared to visual analysis, ...). If further studies manage to replicate the results and demonstrate the superiority of the digital method in terms of repeatability, this tool could potentially bring a lot of value to clinical practices and could be used on a daily basis.

2- The marker CK7 does not predict the future development of fibrosis. Other markers specific to the different components of the ductular reaction should be investigated in order to shed light on the link between ductular reaction and fibrosis development.

I. Introduction

1.1. Fibrose idiopathique de l'allogreffe

a. *Définition et épidémiologie*

Depuis ses débuts en 1963, la transplantation hépatique pédiatrique a connu un progrès continu en termes de résultats, avec actuellement un taux de survie à 10 ans dépassant 85%. [1] Cette augmentation de la survie à long terme a permis de révéler certaines pathologies propres à la greffe hépatique, observées grâce au suivi régulier des patients en post-transplantation. Parmi celles-ci, on retrouve une augmentation progressive dans le temps de la fibrose hépatique. En effet, les biopsies de suivi post-transplantation ont permis de montrer que la majorité des greffes développent de la fibrose dans les 5 ans suivant la transplantation, et que celle-ci s'aggrave en fibrose sévère chez au moins 25% des patients à 10 ans post-transplantation. [2]

La fibrose de la greffe hépatique peut avoir diverses causes (récurrence de la pathologie initiale, rejet tardif de la greffe, hépatite virale chronique, hépatite de novo, complications biliaires et vasculaires, ...). On observe toutefois dans certaines biopsies post-transplantations tardives, le développement inexplicable d'inflammation et de fibrose : des caractéristiques histologiques d'hépatite chronique sont retrouvées chez des patients stables, sans aucun facteur prédisposant à la fibrose, et en l'absence de toute cause explicative reconnue telles que celles précitées. On parle d'hépatite chronique idiopathique ou d'hépatite idiopathique post-transplantation (IPTH ou « idopathic post-transplant hepatitis »). Ces termes sont utilisés afin de décrire des changements inflammatoires inexplicables dans les biopsies post-transplantations tardives. [3,4] Dans l'ensemble, on constate que des caractéristiques compatibles avec un diagnostic d'IPTH peuvent être observées chez 10 à 50% des patients subissant une biopsie protocolaire à 1 an post-transplantation et jusqu'à 60% des enfants à 10 ans post-transplantation, ce qui en fait le diagnostic général le plus fréquent dans les biopsies de revues annuelles d'adultes et d'enfants dans certains centres. La prévalence de l'IPTH augmente avec le temps écoulé post-transplantation. [3]

Des études récentes ont montré qu'une majorité des patients pédiatriques (50 à 70%) atteints d'IPTH finissaient par développer de la fibrose à long terme, pouvant évoluer vers de la fibrose

« en pont » (bridging fibrosis) ou vers de la cirrhose à 10 ans post-transplantation. On parle alors de fibrose idiopathique de l'allogreffe. Ici à nouveau, la prévalence et la sévérité de la fibrose augmentent avec le temps post-transplantation. [5,6]

L'inflammation (IPTH) et la fibrose idiopathique de l'allogreffe représentent ainsi les causes les plus courantes d'anomalies histologiques observées à plus d'un an post-transplantation hépatique. [7]

b. Hypothèse étiologique

Jusqu'à présent, aucune étude n'a réussi à mettre en évidence une cause bien définie au phénomène d'inflammation (IPTH) et de fibrose qu'on qualifie donc d'« idiopathiques ». Une hypothèse émerge cependant, selon laquelle l'IPTH représenterait une forme de rejet tardif de la greffe. Les arguments rapportés en faveur de cette hypothèse sont [7] :

- 1- La présence d'auto/allo-anticorps de façon fréquente, qui peuvent réagir avec les hépatocytes et/ou les voies biliaires du donneur.
- 2- Des antécédents de rejets représentent un facteur de risque pour le développement d'IPTH.
- 3- Certains cas d'IPTH présentent des caractéristiques communes à celles que l'on retrouve dans les rejets aigus ou chroniques.
- 4- Le premier groupe d'IPTH qui a été étudié et décrit était sous une monothérapie par inhibiteur de la calcineurine, après arrêt des stéroïdes.
- 5- Certaines études suggèrent également que l'inflammation (et la fibrose dans une moindre mesure) seraient améliorées ou prévenues en renforçant l'immunosuppression.

c. Histoire naturelle et facteurs prédisposants

Comme mentionné plus haut, l'analyse des différentes biopsies en post-transplantation décrivait une augmentation de la fibrose avec le temps [2,5]. En 2014, Venturi et al. publièrent une première étude rétrospective, reprenant 54 patients pédiatriques transplantés évalués à 6 mois, 3 ans et 7 ans après la transplantation, confirmant une augmentation de la fibrose à long terme chez 74% des patients, mais également une régression de la fibrose chez 26% des patients. [11] Cette nouvelle découverte ouvrit la voie

à une recherche plus approfondie des mécanismes de la fibrogenèse et des facteurs prédisposants de la fibrose idiopathique de l'allogreffe afin de pouvoir agir en amont et espérer trouver des nouveaux traitements pour faire régresser la fibrose.

Une étude récemment menée par l'Université Catholique de Louvain (Varma et al.) [4] a permis de mieux comprendre l'évolution de l'inflammation et de la fibrose idiopathique de la greffe hépatique, ainsi que les facteurs prédisposants de celles-ci.

Il s'agit de la première étude prospective utilisant des biopsies successives à des intervalles réguliers sur une période de 10 ans pour observer l'évolution d'une biopsie à l'autre. Le principe fut donc d'analyser le degré d'inflammation et de fibrose au niveau d'une biopsie au temps T, et de comparer celui-ci au degré d'inflammation et de fibrose au niveau de la biopsie précédente (T-1). Divers paramètres et données au sujet du donneur et du receveur ont également été récoltés afin de mettre en évidence d'éventuels facteurs prédisposants à cette fibrose inexpliquée de la greffe. Ont été exclus de cette étude les patients receveurs décédés, les cas de retransplantation (seconde greffe), les patients ayant présenté des complications biliaires ou vasculaires, les cas de rejet chronique, les patients ayant bénéficié d'un traitement hépatique antérieur ou ayant été exposés à des substances hépatotoxiques, et enfin les cas de transplantation hépato-rénale combinée.

Cette étude vient tout d'abord confirmer les résultats de Venturi et al., en montrant que d'une biopsie à l'autre, l'inflammation et la fibrose peuvent soit augmenter, soit régresser, soit rester inchangées. De plus, on remarque que les patterns d'évolution de l'inflammation et de la fibrose de l'allogreffe, quelle que soit leur localisation (portale, sinusoidale ou centro-lobulaire), sont spécifiques à chaque patient. Cela signifie qu'il n'existe pas un modèle d'évolution qui pourrait être généralisable à tous les patients transplantés, les tendances de progression et de régression de l'inflammation et de la fibrose étant spécifiques au patient.

Ensuite, l'analyse de la fibrose a été divisée en trois zones principales de fibrose observées habituellement dans les biopsies post-transplantation tardives : la zone portale, c'est-à-dire au niveau de l'espace-porte hépatique, la zone sinusoidale et la zone centro-lobulaire. On remarque qu'en fonction de la zone où elle est développée, la fibrose a tendance à évoluer différemment et à être associée à des facteurs prédisposants différents.

Le degré de fibrose portale au temps T était corrélé avec la présence et la sévérité de l'inflammation portale préexistante dans la biopsie antérieure (T-1), la présence d'anticorps anti-HLA (ou DSA : donor specific antibodies) de classe II chez le donneur, et la présence du génotype HLA DRB1 chez le receveur.

En ce qui concerne la fibrose sinusoidale, les principaux facteurs prédisposants sont le statut HLA DRB1 du receveur, l'âge du receveur au moment de la transplantation et le sexe féminin du receveur.

Enfin, la fibrose centro-lobulaire, quant à elle, serait favorisée par la présence antérieure de fibrose à ce même niveau dans la biopsie précédente, et par l'origine de la greffe, lorsqu'elle provient d'un donneur décédé.

Cette étude a également recherché les facteurs prédisposants à l'inflammation elle-même. Il semblerait ainsi que l'inflammation au niveau portal serait favorisée par une inflammation portale antérieure préexistante au niveau de la biopsie qui précède, de la présence d'anti-HLA de classe II chez le donneur et d'autres anticorps non-HLA (ANA, SMA et LKM)¹. Au niveau lobulaire, l'inflammation était corrélée avec la présence d'inflammation antérieure et

Facteurs prédisposants	Inflammation au temps T		Fibrose au temps T		
	Portale	Centrolobulaire	Portale	Sinusoidale	Centrolobulaire
	• Inflammation T-1 • Anti-HLA (DSA) classe II chez le donneur • Autres Ac : ANA, LKM, SMA	• Inflammation T-1 • Autres Ac : ANA, LKM, SMA	• Inflammation T-1 • Anti-HLA (DSA) classe II chez le donneur • Génotype HLA DRB1 chez receveur	• Age du receveur • Receveur de sexe féminin • Génotype HLA DBR1 chez receveur	• Fibrose T-1 • Greffe de donneur décédé

Tableau 1- Facteurs prédisposants de l'inflammation et de la fibrose idiopathiques de l'allogreffe en pédiatrie

¹ ANA : antinuclear antibodies ou anticorps antinucléaires ; SMA : smooth muscle antibodies ou anticorps anti-muscle lisse ; LKM : liver-kidney microsomal antibodies ou anticorps anti-microsomes du foie et du rein (encore appelés anticorps anti-réticulum endoplasmique).

d. Diagnostic

d.1. Méthodes invasives : biopsies protocolaires

Les biopsies de routine, réalisées à plus d'un an après la transplantation hépatique, ont permis de faire la lumière sur l'histoire naturelle de la greffe, et constituent de cette manière l'examen de référence pour le diagnostic d'IPTH et de fibrose idiopathique de la greffe.

A) Analyse anatomopathologique

D'un point de vue histologique, on observe pour la plupart des cas d'IPTH, un infiltrat inflammatoire prédominant en zone portale, composé majoritairement de cellules inflammatoires mononucléaires (figure 1A). De façon assez typique, on retrouvera très peu, voire pas du tout, d'inflammation au niveau des canalicules biliaires et des vaisseaux de l'espace-porte. Différents degrés d'hépatite d'interface (ou nécrose paracellaire)² peuvent également être présents, mais celle-ci sera souvent modérée. L'inflammation peut également se situer en zone centrolobulaire (figure 1B), et peut être associée à une diminution des hépatocytes situés à ce niveau. [7]

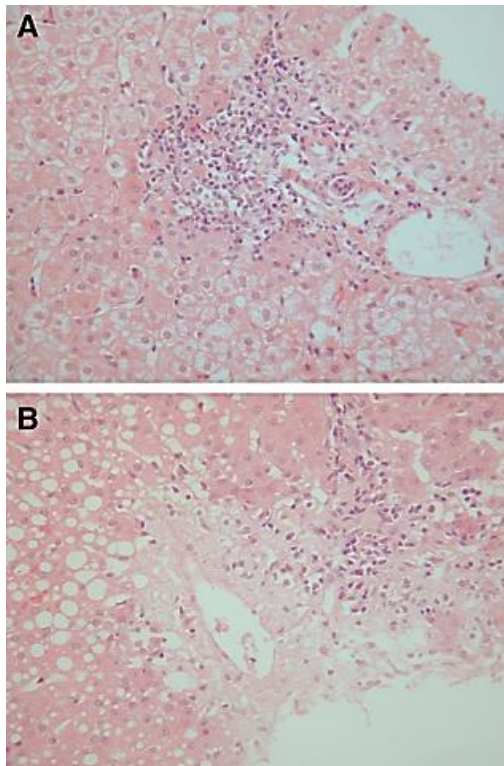


Figure 1- (A) inflammation portale- (B) inflammation centrolobulaire- Kelly et al.[7]

² L'hépatite d'interface (ou nécrose paracellaire ou nécrose périportale) est la destruction de la lame bordante hépatocytaire (première rangée d'hépatocytes bordant un espace porte) par des cellules inflammatoires.

En ce qui concerne la fibrose, trois zones principales ont été décrites comme zone d'apparition de fibrose dans les biopsies tardives post-transplantation : la zone portale, sinusoidale et centrolobulaire. [12] Différents systèmes de scoring semi-quantitatifs ont été développés pour pouvoir évaluer et grader le degré de fibrose en anatomopathologie. Parmi ceux-ci, on peut citer les scores METAVIR, Ishak et Scheuer, qui furent développés pour les patients adultes atteints d'hépatite chronique virale, leur application à la population pédiatrique sera donc moins pertinente. Le LAFSc score (« Liver Allograft Fibrosis Scoring system ») est un système de scoring spécifiquement développé pour l'évaluation de l'allogreffe hépatique en pédiatrie et constitue ainsi le score de premier choix chez cette population.

Score METAVIR

Ce score a été conçu pour les hépatites chroniques virales (l'hépatite C principalement). [13] Il quantifie séparément l'activité (A), qui représente la nécrose et l'inflammation, et la fibrose (F), allant de F0 à F4, se basant principalement sur la fibrose visible en zone périportale. Ces deux éléments mis ensemble permettent de définir des catégories de patients, pour lesquels on peut poser des indications thérapeutiques en fonction de leur catégorie. Il permet également de suivre l'évolution des lésions en présence ou absence de traitement.

Activité	
Hépatite chronique sans activité histologique	A0
Avec activité histologique légère	A1
Avec activité histologique modérée	A2
Avec activité histologique sévère	A3

Fibrose	
Pas de fibrose	F0
Fibrose portale sans septa	F1
Fibrose portale avec quelques ponts ou septa	F2
Nombreux ponts/septa, sans cirrhose	F3
Cirrhose	F4

Tableau 2 - Score METAVIR

SCORE ISHAK

Le score d'Ishak a été adapté pour évaluer la fibrose essentiellement dans les cas d'hépatites auto-immunes. Comme pour le score METAVIR, ce score se focalise sur la fibrose périportale uniquement (6 classes allant de F0 à F6). [14]

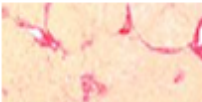
Appearance	Ishak stage: Categorical description	ISHAK	METAVIR
	No fibrosis (Normal)	0	F0
	Fibrosis expansion of some portal areas ± short fibrous septa	1	F1
	Fibrosis expansion of most portal areas ± short fibrous septa	2	F2
	Fibrosis expansion of most portal areas with occasional portal to portal(P-P) bridging	3	
	Fibrosis expansion of portal areas with marked portal to portal(P-P) bridging as well as portal to central(P-C)	4	F3
	Marked bridging (P-P and/or P-C) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5	
	Cirrhosis, probable or definite	6	F4

Tableau 3 – Correspondances entre scores METAVIR et ISHAK – [16]

SCORE LAFSc

Ce score a été développé par Venturi et al. au sein de l'UCL en 2012, sur base d'une population pédiatrique, permettant d'évaluer la fibrose de la greffe en post-transplantation. L'avantage de ce score est qu'il permet de classer séparément la fibrose portale, centrolobulaire et sinusoidale. Ce système de scoring a été validé et adopté par la majorité des centres de transplantation hépatique pédiatrique. [12,15].

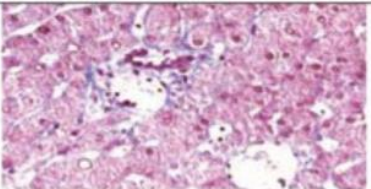
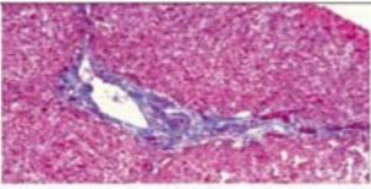
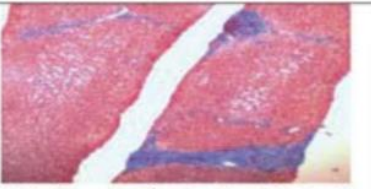
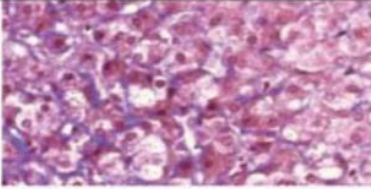
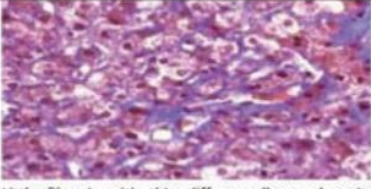
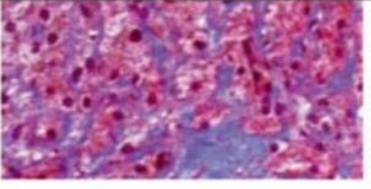
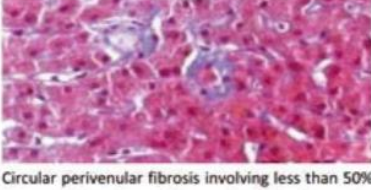
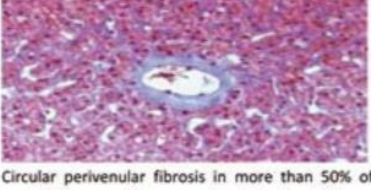
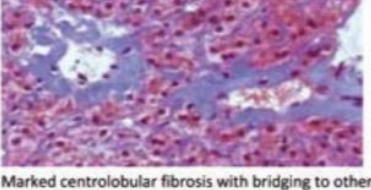
Structure	0	I	II	III
Portal Tract	No Fibrosis	 Non-expanding fibrosis in less than 50% of portal tracts.	 Fibrosis in more than 50% of portal tracts and/or expansion into short fibrous septa into periportal parenchyma.	 Marked expansion of most or all portal tracts with bridging fibrosis expanding to other portal tracts or central areas with or without occasional nodules.
Sinusoids (zones 1, 2)	No Fibrosis	 Little fibrosis with thin focal collagen deposits involving less than 50% of sinusoids.	 Little fibrosis with thin diffuse collagen deposits involving more than 50% of sinusoids, or thicker but focal fibrosis in less than 50% of sinusoids.	 Thick, marked, diffuse sinusoidal fibrosis.
Centrolobular Vein (zone 3)	No Fibrosis	 Circular perivenular fibrosis involving less than 50% of central veins without invasion into the perivenular parenchyma.	 Circular perivenular fibrosis in more than 50% of central areas and/or expansion into short fibrous septa into perivenular parenchyma.	 Marked centrolobular fibrosis with bridging to other central areas and/or portal tracts.

Tableau 4 – Définitions histologiques des stades de fibrose selon le score LAFSc – Venturi et al. [12]

Tous ces scores ont en commun le fait d'être semi-quantitatifs, c'est-à-dire qu'ils stadifient la fibrose en fonction de certains schémas histologiques observés, et non en fonction de la quantité réelle de fibrose. Les valeurs de fibrose obtenues selon ces scores sont des valeurs ordinales (F1, F2, F3, ...) et non des valeurs continues, ce qui rend également l'analyse statistique des données plus difficile et moins précise.

B) Analyse digitale quantitative de la fibrose

Des chercheurs se sont intéressés à développer une méthode d'analyse permettant de quantifier précisément la fibrose et de contourner ainsi les inconvénients de l'analyse anatomopathologique, au moyen d'une analyse des biopsies réalisée par un ordinateur. [17,18]. Pour ce faire, les lames histologiques sont dans un premier temps scannées et envoyées sur un ordinateur sous forme d'images. Une coloration spécifique sera préalablement appliquée aux lames afin de mettre en évidence les zones de fibrose. Ensuite, l'ordinateur se charge de reconnaître les zones fibrosées et les quantifie par un comptage du nombre de pixels. La surface de fibrose calculée est alors rapportée à la surface totale de la lame, il en résulte un rapport appelé le « CPA » pour « Collagen Proportionate Area ». Le CPA est une variable continue qui permet de quantifier le collagène présent dans toute la biopsie, et pas uniquement au niveau des zones visibles à l'œil nu en anatomopathologie.

[15] De cette manière, l'analyse digitale permettrait d'obtenir des résultats de quantification plus précis. De plus, contrairement à l'analyse visuelle histologique, cette technique n'est pas observateur-dépendant, et devrait donc apporter une meilleure reproductibilité.

Une bonne corrélation entre le CPA et les scores semi-quantitatifs histologiques ainsi que les marqueurs sériques a pu être observé, cette corrélation étant meilleure avec les marqueurs sériques. L'intérêt du CPA par rapport aux autres scores est sa capacité à quantifier séparément les différentes zones de fibrose (portale, centrolobulaire et sinusoidale) et donner ainsi une information à la fois topographique et quantitative du développement de la fibrose. [19,20].

d.2. Méthodes non invasives

La biopsie hépatique restant toutefois un geste invasif qui peut être à l'origine de complications (5%) infectieuses ou hémorragiques avec une mortalité estimée à 0,6%, de nouvelles méthodes non invasives pouvant être utilisées en routine sont actuellement de plus en plus investiguées. [7]

A) Imagerie

Elastographie impulsionnelle par ultrasons (Fibroscan)

Cette technique utilise l'émission d'ultrasons comme moyen de détection de la fibrose. Une simple échographie hépatique ne renseigne pas directement sur la quantité de fibrose, elle permet uniquement de mettre en évidence une hypertension portale qui peut être un signe indirect de la cirrhose. Dans l'élastographie impulsionnelle, on mesure la vitesse de propagation de l'onde ultrasonore à travers un tissu : au plus le tissu est dur et rigide, au plus la vitesse de l'onde sera rapide. [31] De cette façon, la vitesse de l'onde ultrasonore est transformée en une mesure de rigidité du parenchyme hépatique, nous donnant indirectement une information sur la quantité de fibrose. Chez l'adulte [32, 33, 34] comme chez l'enfant [35], cette technique a démontré d'excellents résultats pour la détection de stades avancés de fibrose et a été largement validée pour prédire le développement de la cirrhose, mais s'avère moins précise pour évaluer des stades de fibrose plus légers.

Elastographie par résonance magnétique (MRE)

L'élastographie par résonance magnétique utilise le même principe que le Fibroscan, en utilisant cette fois une méthode d'imagerie IRM. L'émission d'une onde acoustique au niveau du parenchyme hépatique permet de quantifier aussi bien la fibrose que l'inflammation, et s'avère d'une grande précision pour évaluer tous les stades de fibrose, y compris les stades les plus précoces. [37] L'évaluation quantitative de la fibrose par cette technique est significativement corrélée avec le grade de fibrose observé en histologie. Un autre avantage est que, contrairement au Fibroscan, la MRE n'est pas opérateur-dépendant et présente un haut degré de reproductibilité inter-observateur. [36]

Une étude a démontré son efficacité à détecter la fibrose en population pédiatrique [38], mais la technique n'a encore jamais été étudiée pour le suivi des enfants en post-transplantation. D'autres inconvénients, comme le coût et la possibilité de recours à la sédation (afin de limiter les mouvements de la respiration), rendent cet examen moins accessible.

B) Marqueurs biologiques

Le dosage de certains marqueurs sériques s'est révélé utile pour détecter la présence de fibrose au niveau hépatique. Ces marqueurs constituent pour la plupart un reflet du renouvellement de la matrice extracellulaire, renseignant indirectement sur la quantité de collagène déposé dans le tissu (exemples de marqueurs : PIIINP, TIMP1, TGFb, YKL-40, laminine, collagène de type IV, MMP). [39] En pratique, la plupart de ces marqueurs présentent une faible performance pour le diagnostic de fibrose si on les dose seuls, excepté l'acide hyaluronique qui s'est révélé très précis pour le diagnostic de fibrose avancée et de cirrhose chez les adultes et en pédiatrie. [40, 41]

Des scores combinant plusieurs marqueurs ont donc été développés afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de ces tests pour l'estimation de la fibrose. Ces scores ont prouvé leur efficacité à détecter la fibrose lorsqu'elle est significativement importante (stades avancés et cirrhose), mais ne permettent pas de faire la distinction entre les stades de fibrose plus précoces. [30, 42, 43]

Le tableau ci-dessous reprend une liste des principaux scores biologiques avec leur niveau de performance.

Test Score	Marqueurs du test	Pronostic	Sensibilité	Spécificité	AUROC
HepaScore	Bilirubine, GGT, acide hyaluronique, alpha-2-macroglobuline, âge, sexe	Fibrose significative	66	79	0,79
Fibrotest	Haptoglobine, alpha-2-macroglobuline, apolipoprotéine A1, GGT, bilirubine	Fibrose significative	92	38	0,79
APRI	ASAT (GOT) et nombre de plaquettes	Fibrose significative	81	75	0,77
Indice de Forn	Nombre de plaquette, âge, GGT, cholestérol	Fibrose significative	88	52	0,76
HA	Acide hyaluronique	Fibrose significative	-	-	0,75
FIB-4	Nombre de plaquettes, ASAT, ALAT, âge	Fibrose significative	64	68	0,74

Tableau 5 – Scores biologiques non-invasifs évaluant la fibrose et leur degré de performance – [30]

d.3. Nouvelles méthodes en cours de recherche

MicroARNs (miRNAs)

Les microARNs sont des petites molécules d'ARN non-codants, qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes après leur transcription. Ils sont par exemple, capables d'induire l'inhibition de l'expression d'un gène (« silencing ») en se fixant à des parties spécifiques de l'ARN messager, empêchant de cette manière la traduction de celui-ci en acides aminés. De récentes recherches ont permis de découvrir que les microARNs intrahépatiques sont prédictors de l'inflammation et du rejet hépatique. Parmi ceux-ci, certains microARNs circulants tels que le miR-122, 148a et 194 se sont révélés être en corrélation avec les lésions hépatiques et le rejet aigu post-transplantation, ainsi que prédictors d'une perturbation des transaminases [8,9,10].

Les microARNs n'ont cependant jamais été étudiés dans le cadre du suivi post-transplantation pédiatrique. D'autres investigations et recherches devraient être menées afin de valider cette nouvelle technique de détection.

e. *Facteurs prédictifs de la fibrose*

La recherche de facteurs pouvant prédire le développement de la fibrose constitue un élément essentiel d'une part afin d'évaluer le pronostic de la greffe et d'autre part afin de prévenir cette fibrose par une prise en charge et la mise en place de traitements plus précoces.

A) ASMA

Les cellules hépatiques stellaires (CHS) sont des cellules situées au niveau de l'espace de Disse qui participent au processus de fibrogenèse hépatique. A l'état quiescentes, elles ont pour rôle principal de stocker la vitamine A. Suite à un contexte inflammatoire et sous l'effet de cytokines, ces CHS sont activées et acquièrent alors des propriétés myofibroblastiques, sécrétant du collagène, dont l'accumulation finit par aboutir à la fibrose du parenchyme. Ceci explique par quel mécanisme l'inflammation conduit au développement de la fibrose. Lorsque les CHS sont activées, elles exposent à leur surface une protéine appelée ASMA (Alpha-Smooth Muscle Actin). [26,27] De récentes études ont pu ainsi confirmer que la quantification immunohistochimique du marqueur ASMA dans une première biopsie était prédictive du développement de fibrose dans une biopsie ultérieure, et ont confirmé de cette manière le caractère prédictif de l'inflammation dans la fibrose de la greffe. [29]

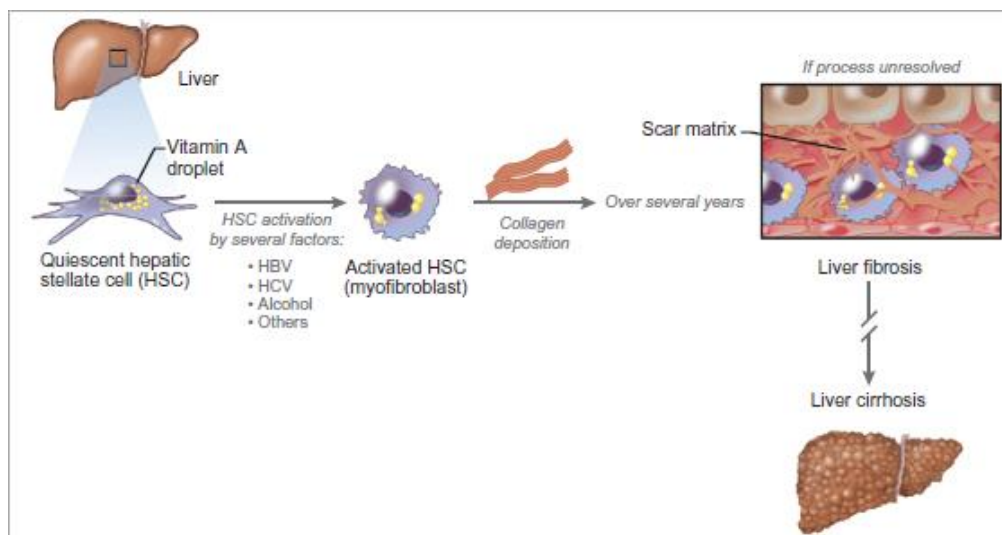


Figure 2 – Mécanisme de la fibrogenèse par activation des cellules hépatiques stellaires - [21]

B) CK7

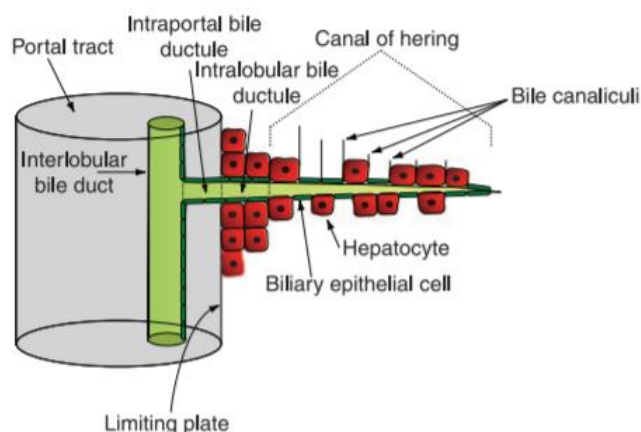
Dans les pathologies chroniques du foie, on retrouve souvent une prolifération des cholangiocytes avec une hyperplasie canalaire, que l'on appelle la réaction ductulaire. Elle se manifeste par la présence de multiples canalicules biliaires observés au bord des espaces-portes. Elle peut également se produire à partir d'une prolifération des cellules progénitrices hépatiques ou rarement, à partir d'une métaplasie ductulaire des hépatocytes. Il s'agit donc d'une réaction « de phénotype ductulaire mais pas nécessairement d'origine ductulaire ».

[22]

Dans les biopsies de pathologies hépatiques et biliaires chroniques, on observe une association entre la réaction ductulaire et le développement de fibrose, particulièrement la fibrose portale. [26,27,28,29] Le mécanisme précis du lien entre la réaction ductulaire et la fibrose reste à ce jour peu élucidé, bien qu'une étude ait suggéré un lien entre réaction ductulaire et cellules hépatiques stellaires. [24] Toutefois, un lien de cause à effet n'a pas encore pu être prouvé, et le fait que la réaction ductulaire soit une réelle cause ou plutôt une conséquence de la fibrose reste un sujet de controverse. [25, 26, 27].

Pour mettre en évidence cette réaction ductulaire, on utilise un marquage immunohistochimique au CK7 (Cytokératine 7), qui est un marqueur exprimé par les cholangiocytes, les cellules épithéliales bordant le canal de Hering et les cellules hépatiques progénitrices qui sont situées à l'intérieur du canal de Hering. [22]

De cette manière, l'augmentation de CK7 dans une biopsie permet d'identifier une réaction ductulaire, et si l'on suppose que la réaction réaction ductulaire prédit la fibrose, CK7 pourrait être un éventuel marqueur prédictif du développement de la fibrose. [22,23]



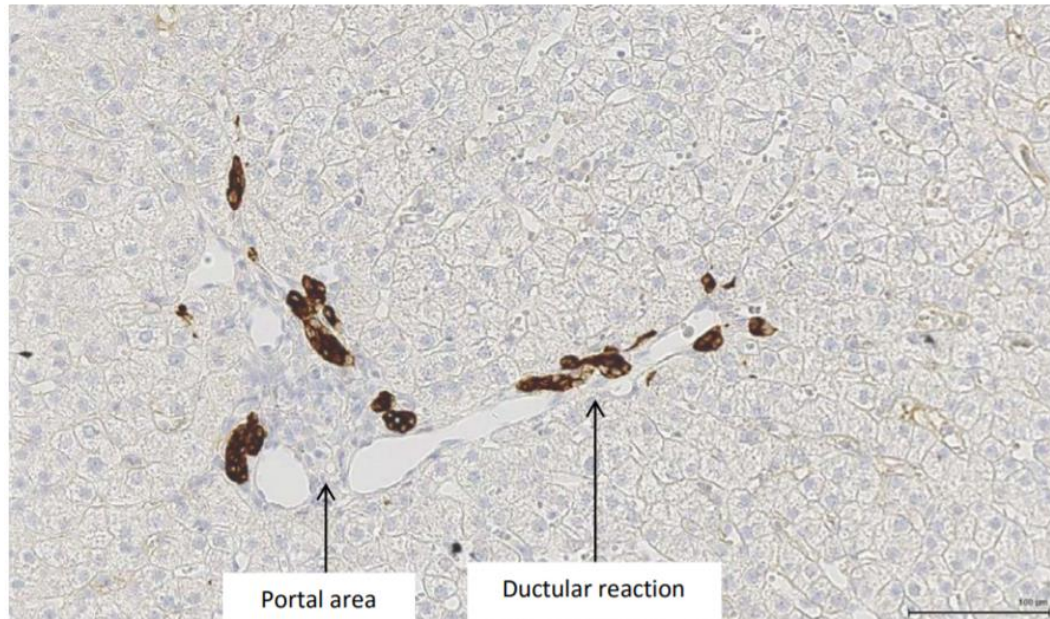


Figure 4 – Mise en évidence de la réaction ductulaire par marquage immunohistochimique au CK7. – Varma S. [15]

1.2. Objectifs de l'étude

1. Comparaison entre quantification digitale et évaluation anatomopathologique de la fibrose dans les biopsies post-transplantation.

Les protocoles d'interprétation des biopsies sont actuellement observateur-dépendants et limités à une analyse ponctuelle de l'inflammation et de la fibrose. Il s'agit d'une analyse histologique visuelle réalisée par un anatomopathologiste, utilisant différents scores tels que les scores Metavir et LAFSc, qui sont des scores d'évaluation semi-quantitatifs, permettant de classer les patients en leur attribuant un grade de fibrose. L'analyse visuelle anatomopathologique a pour désavantages d'une part le fait d'être observateur-dépendant, limitant ainsi la reproductibilité des résultats, et d'autre part l'utilisation de scores semi-quantitatifs qui permettent de donner une estimation du degré de fibrose en utilisant des valeurs ordinales, sans mesurer la quantité réelle de parenchyme fibrosé.

La recherche de nouvelles méthodes utilisant le système informatique a permis d'élaborer un nouveau moyen de quantification de la fibrose appelé le CPA. (cfr. le point d.1. B)

La quantification digitale par le CPA permettrait d'éliminer les biais d'observations inter-observateurs et d'apporter une meilleure reproductibilité des résultats de quantification de la fibrose, ainsi qu'une précision plus importante dans le calcul du degré de fibrose.

Cette étude tentera de confirmer la corrélation observée précédemment entre le système de scoring digital (CPA) et l'analyse visuelle anatomopathologique (METAVIR, LAFSc), et comparer la performance de ces deux méthodes.

2. Evaluer l'utilité pronostique de la quantification du marqueur CK7 dans la prédiction de la fibrose prospective.

Aucune étude n'a encore à ce jour réussi à démontrer un lien de cause à effet entre la réaction ductulaire et le développement de fibrose. Cette étude tentera de vérifier si la réaction ductulaire – mise en évidence par le marqueur CK7 – constitue un réel facteur prédictif de la fibrose.

II. Matériel et méthodes

2.1 Méthodes

Pour chaque patient de l'étude, deux biopsies consécutives dans le temps sont réalisées et analysées, permettant ainsi de nous donner une idée de l'évolution de la fibrose d'une biopsie à l'autre. La première biopsie (B1) est réalisée plus d'un an après la transplantation hépatique et constitue la « biopsie de base », et la seconde biopsie (B2) est réalisée dans les 2 ans qui suivent B1 et constitue la « biopsie de suivi ».

B1 et B2 sont chacune analysées via les deux méthodes que nous voulons comparer :

A) Evaluation histologique

Une première analyse histologique visuelle est réalisée en anatomopathologie selon les scores de fibrose Metavir et LAFSc. Pour chaque biopsie, l'inflammation et la fibrose sont analysées par 3 observateurs indépendants. La sévérité de l'inflammation lobulaire et portale a été gradée selon 4 niveaux : aucune (1), légère (2), modérée (3) et sévère (4).

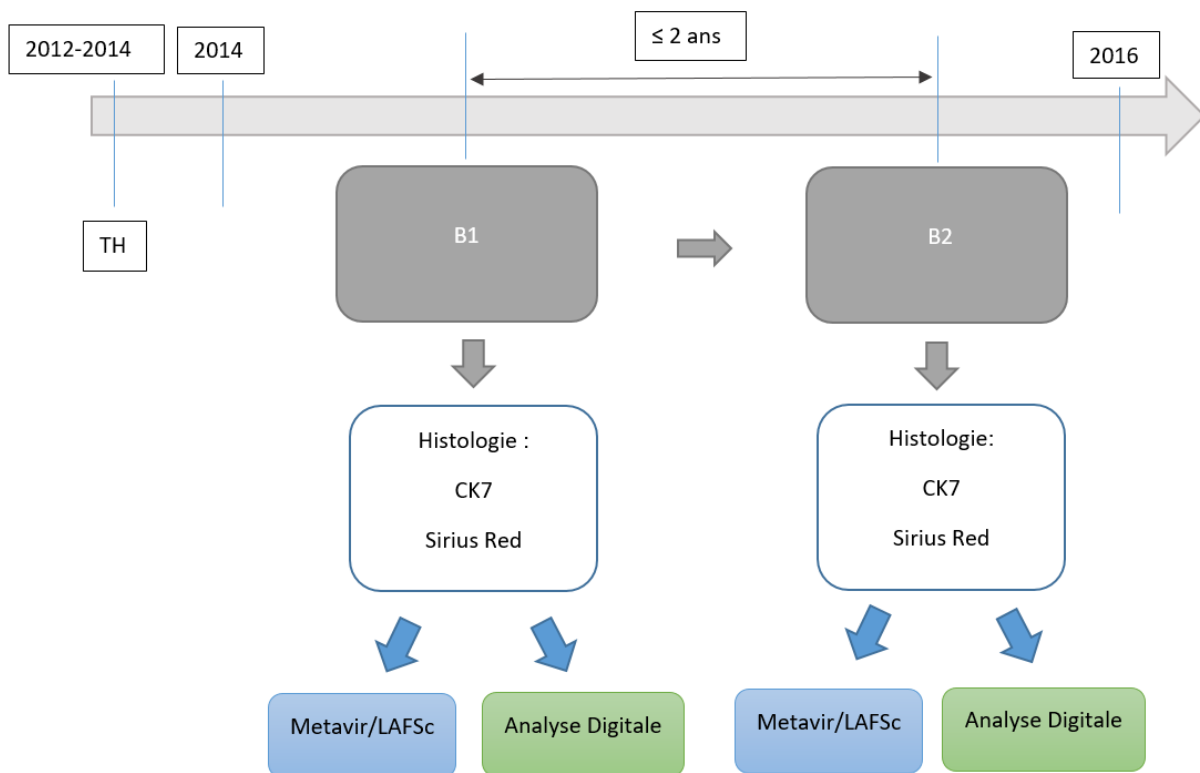
B) Quantification digitale

Une seconde analyse digitale réalisée à l'aide d'un programme informatique de quantification de la fibrose, sur des lames préalablement scannées et exportées vers un ordinateur.

Pour les deux méthodes citées, les biopsies B1 et B2 sont traitées au préalable en histologie au rouge Sirius³ pour l'évaluation de la fibrose, et au marquage immunohistochimique par CK7.

2.2 Patients

Cette étude comprend une cohorte de 46 patients pédiatriques transplantés entre 2012 et 2014 et suivis dans le service d'hépatogastroentérologie pédiatrique des Cliniques Universitaires Saint-Luc, pour lesquels deux biopsies consécutives avaient été réalisées entre l'année 2014 et 2016. Ont donc été inclus uniquement les patients pour lesquels il existait une paire de biopsies (une biopsie de base et une biopsie de suivi).



TH = Transplantation Hépatique ; B1 = première biopsie/biopsie de base ; B2 = deuxième biopsie/biopsie de suivi

³ Le rouge Sirius (« Sirius Red » en anglais) est un colorant acide hydrophile qui teinte en rouge les fibres de collagène, en microscopie optique.

2.3 Matériel

a. *Fonctionnement du système de quantification digital*

❖ *Quantification digitale de la fibrose par le CPA*

La fibrose hépatique a été quantifiée sur des lames histologiques colorées au rouge Sirius, numérisées ensuite au grossissement x20 en utilisant le scanner de lames « Leica SCN400 Slide Scanner » (Leica Biosystems, Wetzlar, Allemagne). Ces lames sont ensuite exportées vers un ordinateur, où elles sont analysées par le logiciel Visiopharm version 6.0.0 (Hørsholm, Danemark). Afin de réaliser une quantification par des calculs logiciels, des protocoles d'analyse d'image - appelés « APPS » - sont utilisés. Une série d'APPS ont été conçus dans cette étude afin de calculer le CPA total et le CPA régional (portal, centrolobulaire, sinusoïdal). Ci-dessous, les différentes étapes constituant une APP de façon générale (a), l'APP spécifique pour le CPA total (b) et le CPA régional (c) :

a) Le fonctionnement général d'une APP se fait comme suit :

- Étape 1 : Configuration - Définition du grossissement et des régions dans lesquelles l'analyse sera effectuée.
- Étape 2 : Pré-traitement - Spécification des caractéristiques de l'image à mettre en évidence afin de les détecter.
- Étape 3 : Classification - Sur base des caractéristiques sélectionnées ci-dessus, chaque pixel est alors classé en lui donnant une "étiquette" (par exemple un tissu, un fond, une coloration au rouge Sirius, etc.) en utilisant une méthode de délimitation.
- Étape 4 : Post-traitement - Raffinage et contrôle de la qualité de la classification.
- Étape 5 : Calcul

b) Étapes séquentielles de L'APP spécifique pour le CPA total :

- Étape 1 et 2 : Le tissu hépatique est dans un premier temps distingué de l'arrière-fond à un grossissement digital faible (4x) en utilisant une méthode de classification par délimitation basée sur les caractéristiques RVB-bleu de

l'image. Les bords tissulaires, qui peuvent être parfois marqués de façon aspécifique, ont été coupés et exclus de l'analyse, de même que les petites zones de tissu non pertinentes.

- Étape 3 : Classification des pixels en « tissu » ou en « verre » (arrière-fond)
- Étape 4 : Le post-traitement inclut :
 1. Élimination des petites zones de tissus
 2. Élimination des bords tissulaires (zones périphériques du tissu) au du marquage aspécifique.
- Étape 5 : Calcul
 1. Classification des pixels en SR (Sirius Red) + ou SR - en fonction de leur coloration/marquage.
 2. Élimination des artefacts de coloration.
 3. Calcul du CPA total = $\frac{\text{Pixels SR} +}{\text{Pixels totaux dans le tissu}} \times 100$

De la même façon, il est possible de calculer un CPA régional (portal, sinusoïdal, centrolobulaire) en utilisant d'autres APP antérieurement (APP de délimitation 1 et 2, comme décrit ci-dessous), afin de délimiter ces régions d'intérêt. Le CPA pourra ensuite être calculé dans ces région par une APP de quantification comme décrit pour le CPA total.

c) Étapes séquentielles de L'APP spécifique pour le CPA régional (portal, sinusoïdal, centrolobulaire) :

- Étape 1 : APP de délimitation 1 :
 1. Les veines centrolobulaires et les espaces-portes ont d'abord été délimités avec l'outil « ROI » (« Region of interest »), qui permet de faire une délimitation manuelle à l'ordinateur de ces régions.
 2. Ces délimitations ont été automatiquement prolongées à l'intérieur du tissu en deux zones concentriques de 62,5 µm chacune (correspondant à 50 pixels), définies comme zones péri-portale et péri-centrolobulaire.

- Etape 2 : APP de délimitation 2 :
 1. Conçue pour détecter le tissu sinusoïdal en se basant sur les étapes de prétraitement mettant en évidence les caractéristiques RVB-bleu de l'image.
 2. Des étapes de post-traitement ont été appliquées pour retirer les morceaux tronqués de tissu (<5000 μm^2) et les grandes zones de collagène (> 1000 μm^2) correspondant à une fibrose en pont (« bridging fibrosis » ou à la capsule hépatique.
- Etape 3 : APP de quantification :

Conçue d'une manière similaire à l'APP du CPA total pour détecter et quantifier les pixels SR +. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de zone SR + dans les zones analysées.

❖ *Quantification digitale du marquage au CK7*

Le principe est le même que pour le calcul du CPA : le tissu est d'abord détecté et distingué de l'arrière-fond à un faible grossissement numérique (5x). Ensuite, les extrémités des tissus tout comme les petits morceaux de tissus non pertinents ont été exclus de l'analyse. Les pixels CK7- positifs ont ensuite été détectés dans le tissu, précédemment délimité au gros grossissement (20x). Les résultats sont finalement exprimés en « pourcentage de surface CK7- positifs », calculés par la formule suivante : $[\text{zone CK7-positive} / \text{surface tissulaire totale}] \times 100$.

b. Méthodes statistiques

❖ *Corrélation quantification digital et analyse histologique.*

Cette étude évalue la concordance entre la gradation visuelle effectuée par l'anatomopathologiste (Metavir et LAFSc) et la quantification numérique en utilisant le module CPA. Etant donné que le score visuel est une variable ordinale tandis que la quantification numérique produit une variable continue, les PCC (« Polyserial correlation

coefficients »)⁴ ont été utilisés. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les packages « polycor » (Polychoric and Polyserial correlations) du logiciel statistique R version 3.2.3.

❖ *Corrélation entre réaction ductulaire, inflammation et fibrose*

L'association entre le pourcentage de surface CK7-positif et le score de fibrose concomitante, classé par le Metavir (échelle ordinale de 0 à 4) et le LAFSc (échelle ordinale de 0 à 9), a été évalué en utilisant les modèles de régression logistique ordinale. Les mêmes modèles de régression ont également été utilisés pour évaluer l'association entre pourcentage de surface CK7-positif et réaction ductulaire (échelle ordinale de 0 à 3), inflammation lobulaire (échelle ordinale de 0 à 3), et inflammation des voies portales (échelle ordinale de 0 à 3). La différence de sévérité de la fibrose entre la fibrose initiale et la fibrose de suivi, classée selon les scores Metavir et LAFSc, a été appelée « variation prospective de la fibrose » et décrite en trois catégories (décroissante, stable ou croissante). L'association entre le pourcentage de surface CK7-positif sur la biopsie de base et les scores de « variation prospective de la fibrose » a été évaluée pour les deux systèmes de notation (digital et visuel) par des modèles de régression logistique ordinale. Les P-valeurs <0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Les modèles de régression ordinale ont été construits en utilisant le package "ordinal" du logiciel R.3.2.1 (<http://www.rproject.org>), tandis que les analyses de courbe ROC ont été effectuées en utilisant le package "ROCR".

III. Résultats

3.1. Corrélation élevée entre le système de scoring digital et le système de scoring visuel

La comparaison entre les résultats de l'analyse digitale (exprimés en CPA total) et les résultats observés visuellement en anatomopathologie (via les scores Metavir et LAFSc-total) a révélé une haute corrélation entre ces deux méthodes (voir annexe 1), aussi bien pour la comparaison avec le Metavir (PCC = 0,857) qu'avec le LAFSc (PCC = 0,871), ce qui confirme leur concordance rapportée précédemment dans la littérature. [19,20]

⁴ Coefficients de corrélation s'appliquant à des données ordinales.

L'analyse de la fibrose par régions a montré une corrélation entre le CPA régional et le score LAFSc nettement meilleure au niveau de la fibrose portale (PCC = 0,75) qu'au niveau sinusoïdale (PCC = 0,21) et centrolobulaire (PCC = 0,053) (voir annexe 3).

3.2. Corrélation élevée entre l'analyse digitale et visuelle pour évaluer la variation prospective de la fibrose

La variation prospective de la fibrose a été évaluée en observant la différence de sévérité de la fibrose entre les deux biopsies provenant d'un même patient (PB2 – PB1). Les résultats CPA totaux obtenus par la méthode digitale pour la variation de la fibrose correspondent aux résultats des scores Metavir et LAFSc-total, avec des coefficients de corrélation PCC de 0,735 pour le Metavir et de 0,94 pour le LAFSc-total (voir annexe 2).

Malgré ces concordances, on constate un large éventail de valeurs de CPA pour une même catégorie de score visuel (aussi bien pour le score Metavir que LAFSc). Par exemple, on observe qu'un patient classé comme stade 2 par le Metavir à sa première biopsie présente une variation du CPA pour la même biopsie allant de 18 à 40 %. (Annexe 1, graphe PB1)

On observe également que des patients n'ayant présenté aucune évolution de leurs scores Metavir et LAFSc d'une biopsie à l'autre (PB2- PB1 = 0), peuvent toutefois présenter une variation importante de la sévérité de la fibrose lorsqu'on utilise le CPA. Par exemple, pour un patient présentant un score Metavir PB2-PB1 = 0, on observe des valeurs de CPA comprises entre -27 et 34 %. (Annexe 2)

3.3. Association significative entre le pourcentage de surface CK7-positif et la sévérité de la réaction ductulaire, de l'inflammation portale et de la fibrose au niveau de la même biopsie

Le pourcentage de surface CK7-positif calculé sur la biopsie de base a montré avoir un impact statistiquement significatif sur le score de fibrose obtenu sur la même biopsie, aussi bien lorsqu'il est obtenu par le Metavir (P-valeur = 0,02) que par le LAFSc-total (P-valeur = 0,01). De même, le pourcentage de surface CK-positif était significativement associé à l'étendue de la réaction ductulaire (P-valeur = 0,006) et de l'inflammation portale (P-valeur =

0,01), mais dans une moindre mesure à l'inflammation lobulaire (association non significative, P-valeur = 0,17). (Annexes 4 et 5).

3.4. Absence de prédiction de l'évolution de la fibrose par le marquage au CK7

Le pourcentage de surface CK7-positif calculé sur la biopsie de base n'a pas montré d'association statistiquement significative avec la variation prospective de la fibrose évaluée avec le score Metavir (P=0,36) et le score LAFSc (P= 0,25). (Annexe 6)

IV. Discussion

4.1. Quantification digitale de la fibrose de l'allogreffe hépatique

Afin de dépasser les limites de l'évaluation visuelle de la fibrose (scores semi-quantitatifs en anatomopathologie), un système de calcul digital de la quantité de fibrose (méthode d'estimation par le CPA) a été développé depuis quelques années. Cet outil n'a cependant jamais été considéré comme suffisamment « intelligent » que pour avoir sa place en clinique, vu qu'il n'éliminait pas de lui-même les zones d'artefacts, les zones non pertinentes (capsule, larges vaisseaux,...) qui contribuent à une surestimation de la fibrose, et n'a ainsi été utilisé que dans le domaine de la recherche.

Le nouveau modèle digital développé dans cette étude se distingue des anciens modèles sur plusieurs points : tout d'abord de par sa capacité à calculer la fibrose de façon régionale, en distinguant le CPA total des CPA régionaux (portale, centrolobulaire, sinusoidale), permettant d'apporter ainsi une information supplémentaire sur la topographie de la fibrose développée. Ensuite, ce nouveau modèle plus performant élimine de lui-même les zones non pertinentes et diminue ainsi le risque de surestimation, et comporte des étapes de contrôle de la qualité du traitement. Il possède également une vitesse de traitement plus rapide. Enfin, le plus important et qu'il a montré une bonne capacité à discriminer des variations très légères de la sévérité de la fibrose qui n'ont pas été détectées par les scores visuels.

Ce nouveau modèle répond donc à de nombreuses lacunes rencontrées précédemment et est prêt actuellement pour une utilisation hors de la recherche dans le domaine de la

pratique clinique. Toutefois, bien qu'une bonne corrélation ait été retrouvée entre l'évaluation visuelle et la quantification digitale, il reste encore à démontrer que cette dernière méthode est bien meilleure au niveau de sa reproductibilité afin de pouvoir envisager son utilisation courante et lui permettre de remplacer les scores anatomopathologiques. Une des perspectives d'avenir serait d'envisager une prochaine étude où la même biopsie est analysée deux fois (évaluation visuelle et quantification digitale) par deux observateurs indépendants, et comparer les résultats obtenus par les deux analyses indépendantes, ce qui nous permettrait de déterminer objectivement la méthode la plus reproductible. D'autres études seront également nécessaires par la suite pour établir des critères thérapeutiques et des protocoles de traitement et de suivi en fonction de la valeur CPA obtenue pour une biopsie.

4.2. Facteurs prédictifs de la fibrose de l'allogreffe

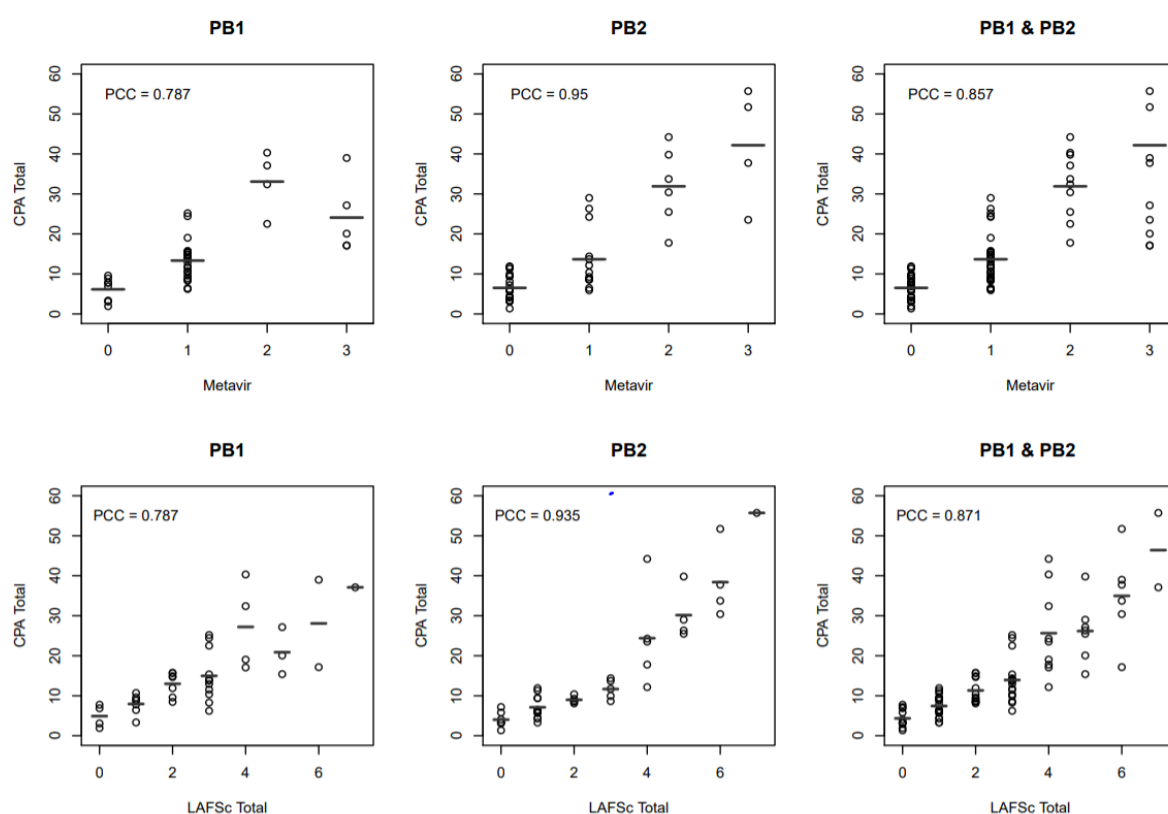
L'objectif de cette étude était de voir si la réaction ductulaire, mise en évidence par le marquage CK7, était un facteur prédictif de l'évolution de la fibrose. Dans les modèles animaux et humains, celle-ci s'est en effet avérée être intimement liée au dépôt de collagène dans le parenchyme hépatique, sans pour autant que l'on puisse affirmer un lien direct de cause à effet entre ces deux entités. Les résultats nous montrent que la réaction ductulaire est concomitante et coexistante avec la fibrose en un temps donné, mais qu'elle n'a pas de rôle dans la prédiction de son futur développement. Elle est également associée à l'inflammation, principalement au niveau portal.

CK7 n'est donc pas un marqueur prédictif de la fibrose, mais on ne peut pas pour autant en tirer la conclusion que la réaction ductulaire ne l'est pas : il existe en effet une possibilité que la réaction ductulaire puisse être composée de différentes variantes et que chacune de celles-ci puissent conduire à un résultat différent. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la phase proliférative de la réaction ductulaire stimulerait les myofibroblastes à devenir fibrogéniques tandis que la phase de régression de la réaction ductulaire serait non-fibrogénique. Dans ce cas, il nous faut chercher d'autres marqueurs que le CK7 qui puissent être spécifiques de chaque phase et faire la distinction entre les composantes de la réaction ductulaire.

V. Conclusion

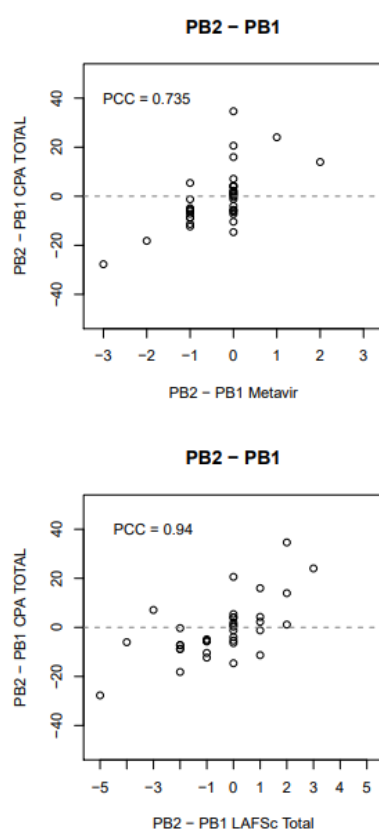
Avec les progrès de la transplantation hépatique pédiatrique, de nouvelles pathologies propres à la greffe ont pu être mises en évidence, dont la fibrose idiopathique de l'allogreffe, qui se définit par le développement de fibrose post-transplantation sans cause explicative démontrée à ce jour. Dès lors, la recherche de facteurs prédisposants et prédictifs, ainsi que la mise au point de méthodes d'évaluation et de quantification de cette fibrose s'avèrent primordiaux afin d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la fibrogenèse et l'évolution naturelle de la pathologie, et d'autre part afin de permettre la mise au point de nouveaux traitements préventifs et curatifs et de nouveaux protocoles de suivi plus adaptés. Les objectifs de cette étude étaient d'une part de comparer une nouvelle méthode de quantification digitale de la fibrose avec les méthodes d'évaluation visuelles standards, et d'autre part d'évaluer l'utilité pronostique du marqueur CK7 dans la prédiction de la fibrose. Les résultats ont montré une importante corrélation entre la méthode digitale et visuelle pour la quantification de la fibrose ponctuelle et la variation prospective de fibrose, montrant ainsi la pertinence de l'utilisation de cet outil en pratique clinique au vu de ses nombreux avantages (observateur-indépendant, rapidité de traitement des données, contrôle de qualité des éventuelles sur/sous-estimations, précision des résultats par rapport à l'analyse visuelle, ...). Il reste toutefois encore à prouver la supériorité de cette méthode en comparant sa reproductibilité avec celle des méthodes standards. Les résultats concernant la deuxième hypothèse montrent que CK7 n'est pas un marqueur prédictif de la fibrose, mais qu'il est coexistant et simultané avec la fibrose ponctuelle sur une même biopsie. D'autres recherches dans le lien entre la réaction ductulaire et la fibrose devraient être menées afin de trouver des marqueurs prédictifs potentiels.

Annexe 1 – Comparaison des résultats CPA total et des scores Metavir/LAFSc-total

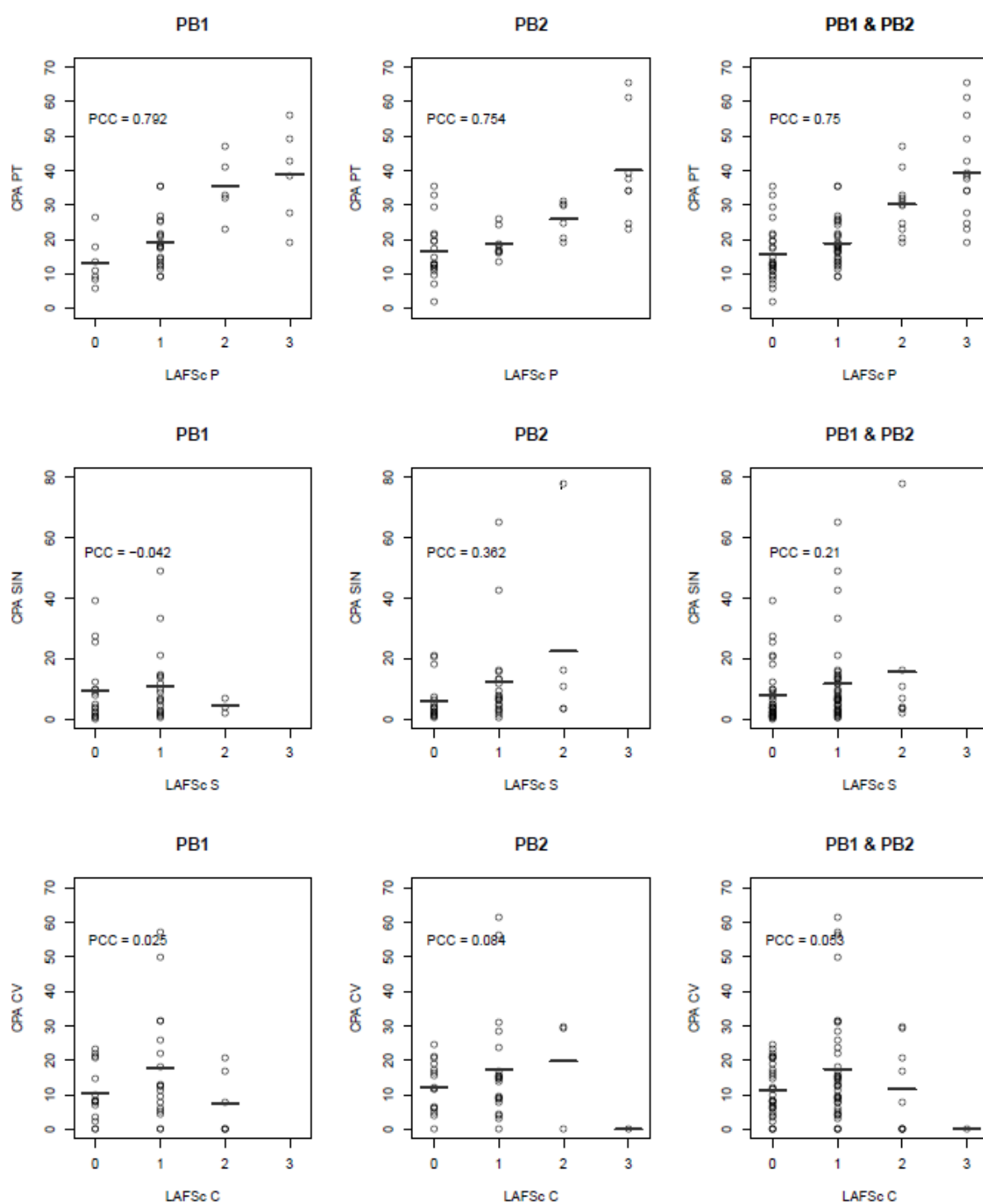


PB1 = première biopsie ; PB2 = biopsie de suivi ; PB1 & PB2 = résultats cumulés de PB1 et PB2

Annexe 2 – Comparaison entre le CPA total et les scores Metavir/LAFSc-total pour l'évaluation de la variation prospective de la fibrose



Annexe 3 – Comparaison du CPA régional et du score LAFSc-régional

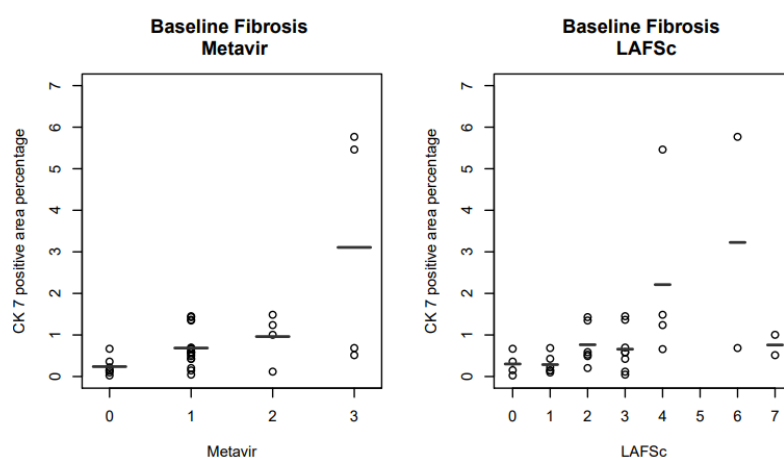


PT = Portal Tract (région de l'espace-porte)

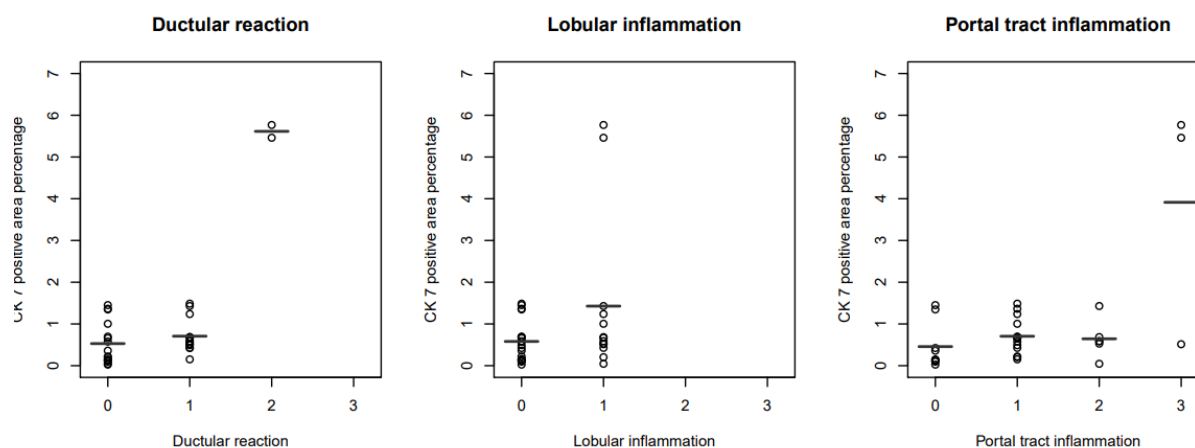
SIN = région sinusoïdale

CV = Centrolobular Vein (région centrolobulaire)

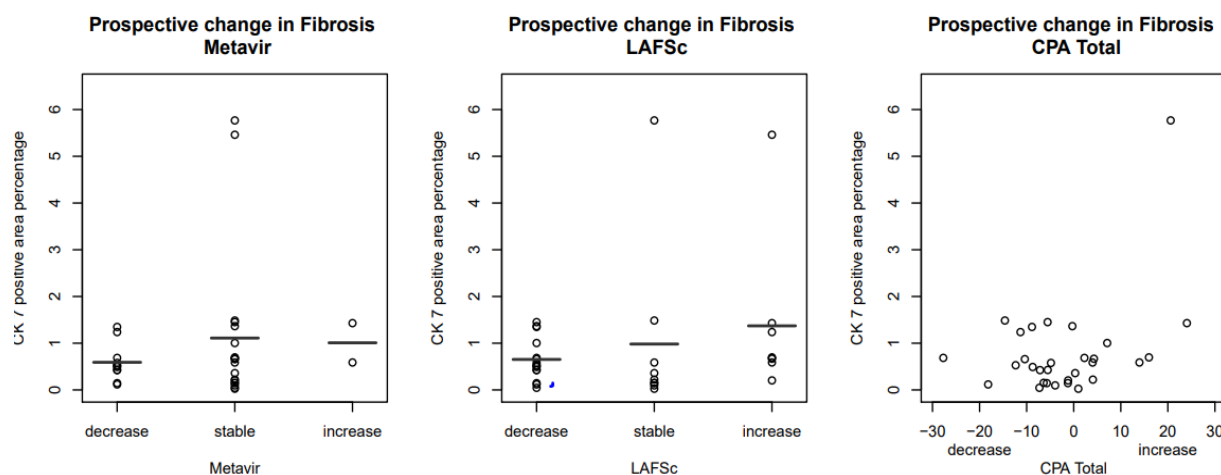
Annexe 4 – Association entre le pourcentage de surface CK7-positif et le score de fibrose Metavir/LAFSc-total sur la biopsie de base (PB1).



Annexe 5 – Association entre le pourcentage de surface CK7-positif et l'étendue de la réaction ductulaire, de l'inflammation portale et de l'inflammation lobulaire au niveau de la biopsie de base (PB1).



Annexe 6 – Association non significative entre le pourcentage de surface CK7-positif et variation prospective de la fibrose évaluée par les scores Metavir/LFASc et par le CPA.



VI. Bibliographie

1. Bourdeaux C, Brunati A, Janssen M, de MC, Otte JB, Sokal E, et al. Liver retransplantation in children. A 21-year single-center experience. *Transpl Int* 2009 Apr;22(4):416-22.
2. Scheenstra R, Peeters PM, Verkade HJ, Gouw AS. Graft fibrosis after pediatric liver transplantation: ten years of follow-up. *Hepatology* 2009 Mar;49(3):880-6.
3. Hubscher SG. What is the long-term outcome of the liver allograft? *J Hepatol* 2011 Sep;55(3):702-17.
4. Varma, S. et al. Progressive Fibrosis Is Driven by Genetic Predisposition, Allo-Immunity, and Inflammation in Pediatric Liver Transplant Recipients. *EBioMedicine* 9 (2016): 346–355. *PMC*. Web. 13 Mar. 2018.
5. Evans HM, Kelly DA, McKiernan PJ, Hubscher S. Progressive histological damage in liver allografts following pediatric liver transplantation. *Hepatology* 2006 May;43(5):1109-17.
6. U.D. Ekong, H. Melin-Aldana, R. Seshadri, J. Lokar, D. Harris, P.F. Whittington, *et al.* Graft histology characteristics in long-term survivors of pediatric liver transplantation
7. Kelly D, Verkade HJ, Rajanayagam J, McKiernan P, Mazariegos G, Hubscher S. Late graft hepatitis and fibrosis in pediatric liver allograft recipients: Current concepts and future developments. *Liver Transpl* 2016 Nov;22(11):1593-602.
8. Farid WR, Pan Q, van der Meer AJ, de Ruiter PE, Ramakrishnaiah V, de JJ, et al. Hepatocytederived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2012 Mar;18(3):290-7.
9. Steer CJ, Subramanian S. Circulating microRNAs as biomarkers: a new frontier in diagnostics. *Liver Transpl* 2012;18:265–269.
10. Wei L, Gong X, Martinez OM, Krams SM. Differential expression and functions of microRNAs in liver transplantation and potential use as non-invasive biomarkers. *Transpl Immunol* 2013;29:123–129.
11. Venturi C, Sempoux C, Quinones JA, Bourdeaux C, Hoyos SP, Sokal E, et al. Dynamics of allograft fibrosis in pediatric liver transplantation. *Am J Transplant* 2014 Jul;14(7):1648-56
12. Venturi C, Sempoux C, Bueno J, Ferreres Pinas JC, Bourdeaux C, Abarca-Quinones J, et al. Novel histologic scoring system for long-term allograft fibrosis after liver transplantation in children. *Am J Transplant* 2012;12:2986–2996.
13. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996 Aug;24(2):289-93.
14. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995 Jun;22(6):696-9.

15. Varma S. Study of liver allograft : immune mediated fibrosis post-transplant (LIFT), predicting fibrogenesis and digital quantification of histological characteristics.
16. Carmen Fierbinteanu Braticevici, Raluca Papacoccea, Laura Tribus and Anca Badarau (2011). Can We Replace Liver Biopsy with Non-Invasive Procedures?, Liver Biopsy, Dr Hirokazu Takahashi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/19527.
17. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997 Apr;25(4):1028-31.
18. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol* 1998 Mar;28(3):439-46
19. Tsochatzis E, Bruno S, Isgro G, Hall A, Theocharidou E, Manousou P, et al. Collagen proportionate area is superior to other histological methods for sub-classifying cirrhosis and determining prognosis. *J Hepatol* 2014 May;60(5):948-54.
20. Huang Y, de Boer WB, Adams LA, MacQuillan G, Rossi E, Rigby P, et al. Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int* 2013 Sep;33(8):1249-56.
21. Ismail MH, Pinzani M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. *Hepat Med.* 2011;3:69–80.
22. Roskams T.A, Theise N.D, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree : canals, ductules, and ductular reactions in human liver. *Hepatology* 2004 June; 39 : 1739-1745.
23. Bateman AC, Hübscher SG. Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology* 2010 ; 56 : 415-425.
24. Kordes C, Sawitza I, Gotze S, et al. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124:5503–15.
25. Williams MJ, Clouston AD, Forbes SJ. Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology* 2014 Feb;146(2):349-56.
26. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011 Apr;25(2):195-206.
27. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015 May;64(5):830-41.
28. Clouston AD, Powell EE, Walsh MJ, Richardson MM, Demetris AJ, Jonsson JR. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 2005 Apr;41(4):809-18.

29. Varma S, St  phenne X, Komuta, M, et al. The histological quantification of alpha-smooth muscle actin predicts future graft fibrosis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2017;21:e12834.
30. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2013;158:807–820.
31. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1705-13.
32. Van Beers BE, Daire JL, Garteiser P. New imaging techniques for liver diseases. *J Hepatol* 2015;62:690-700.
33. Lutz HH, Schroeter B, Kroy DC, Neumann U, Trautwein C, Tischendorf JJ. Doppler ultrasound and transient elastography in liver transplant patients for noninvasive evaluation of liver fibrosis in comparison with histology: a prospective observational study. *Dig Dis Sci* 2015;60:2825-2831.
34. Crespo G, Lens S, Gambato M, Carrion JA, Marino Z, Londono MC, et al. Liver stiffness 1 year after transplantation predicts clinical outcomes in patients with recurrent hepatitis C. *Am J Transplant* 2014;14:375-383.
35. Nobili V, Vizzutti F, Arena U, Abraldes JG, Marra F, Pietrobattista A, et al. Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008;48:442-448.
36. Banerjee R, Pavlides M, Tunncliffe EM, Piechnik SK, Sarania N, Philips R, et al. Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. *J Hepatol* 2014;60: 69-77.
37. Singh S, Venkatesh SK, Wang Z, Miller FH, Motosugi U, Low RN, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance elastography in staging liver fibrosis: a systematic review and metaanalysis of individual participant data. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:440-451.
38. Xanthakos SA, Podberesky DJ, Serai SD, Miles L, King EC, Balistreri WF, Kohli R. Use of magnetic resonance elastography to assess hepatic fibrosis in children with chronic liver disease. *J Pediatr* 2014;164:186-188.
39. Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, Becka M, Burt A, Schuppan D, et al.; for European Liver Fibrosis Group. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 2004;127:1704-1713. 62)
40. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:779-786.

41. Hartley JL, Brown RM, Tybulewicz A, Hayes P, Wilson DC, Gillett P, McKiernan P. Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with hepatic disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43:217-221.
42. Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F. Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomark Insights* 2012;7:105-17.
43. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2015 Nov 7;21(41):11567-83.