Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité

Physiologie et Physiopathologie (ED 394)

Présenté par

M^{elle} Larysa FEDCHUK

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC-Paris 6)

Sujet de la thèse:

Progression et tests diagnostiques de la stéatose hépatique non alcoolique

Soutenue le **30 Septembre 2014** devant le jury composé de:

Professeur Oppert Jean Michel, PU-PH, Université Paris 6, Président du jury
Professeur Nguyen-Khac Eric, PU-PH, Université de Picardie, Rapporteur
Professeur Mallet Vincent, PU-PH, Université Paris Descartes, Rapporteur
Docteur Serfaty Lawrence, PH, Université Paris 6, Examinateur
Docteur Boursier Jérôme, PH, Université d'Angers, Examinateur

Directeur de Thèse: Professeur Ratziu Vlad, PU-PH, Université Paris 6
Co-directrice de Thèse: Professeur Housset Chantal, PU-PH, Université Paris 6

Table des Matières

Page

Remerciements ……..... 4

Liste des Abréviations 5

Résumé..... 7

Summary……..... 9

Liste de publications en rapport avec la thèse..... 11

Objectifs de la thèse..... 12

Chapitre I. Stéatose hépatique non alcoolique 13

I-1. Définition..... 13

I-2. Description originelle..... 14

I-3. Epidémiologie..... 14

I-4. Facteurs de risque..... 16

I-5. Histoire naturelle…… 16

I-6. Pathophysiologie…… 19

I-7. Diagnostic..... 21

I-7-1. Ponction biopsie hépatique..... 22

I-7-2. Méthodes d'imagerie 24

I-7-3. Marqueurs non-invasifs..... 26

I-7-3-1. Marqueurs non-invasifs pour prédire la NASH…….. 26

I-7-3-2. Marqueurs non-invasifs de fibrose…… 30

Chapitre II. Evaluation histologique de la NAFLD…… 34

II-1. Indications de PBH actuelles chez patients atteints de la NAFLD…….. 34

II-2. Technique de la PBH…… 34

II-3.Complications de la PBH…….. 35

II-4. PBH transjugulaire…… 36

II-5. Diagnostic histologique de la NAFLD/NASH…….. 36

II-6. Classifications histologiques…… 37

II-7. Limitations de biopsie hépatique…… 40

II-7-1. Erreurs d'échantillonnage…… 40

II-7-2. Variabilité inter- et intra-observateur…… 42

Chapitre III. Elastographie impulsionnelle 44

III-1. Caractéristiques techniques..... 44

III-2. Limitations de l'élastographie impulsionnelle..... 45
III-2-1. Applicabilité..... 46
III-2-2. Effet operateur..... 47
III-2-3. Reproductibilité..... 47
III-2-4. Facteurs confondants..... 48
III-3. Performance diagnostique de l'élastographie..... 50
III-3-1. Méthodologie dans l'évaluation de la performance diagnostique..... 50
III-3-2. Performance diagnostique d'élastographie dans les hépatopathies chroniques.. 51
III-3-3. Performance diagnostique d'élastographie dans la NAFLD 53
III-4. Valeur pronostique de l'élastographie 55

Chapitre IV. Biomarqueurs non-invasifs de stéatose 58
IV-1. Performance diagnostic des marqueurs non-invasifs de stéatose..... 63

Chapitre V. *Article 1:* "A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver"…… 66
V-1. Objectifs du travail 66
V-2. Discussion de l'article 1..... 75

Chapitre VI. *Article 2:* "Clinically significant variability of elastometry on short-term follow-up in patients with chronic liver diseases"..... 79
VI-1. Objectifs du travail…… 79
VI-2. Tableaux supplémentaires de l'article 2..... 112
VI-3. Discussion de l'article 2..... 122

Chapitre VII. *Article 3:* "Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease"..... 124
VII-1. Objectifs du travail…… 124
VII-2. Tableaux supplémentaires de l'article 3..... 149
VII-3. Discussion de l'article 3..... 154

Chapitre VIII. Conclusion 156

Chapitre IX. Références bibliographiques..... 158

Chapitre X. *Article annexe*: " Progression from isolated steatosis to steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease**"..... 175**

Remerciements

Ce manuscrit conclut quatre années de travail, je tiens en quelques mots à exprimer ma gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, on apporté leur soutien et contribué à la réalisation de ce travail.

J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur Thierry Poynard, pour m'avoir accueilli au sein du service d'Hépato-gastro-entérologie à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière et pour l'opportunité de réaliser ce travail.

Ma reconnaissance toute particulière est destinée au Professeur Vlad Ratziu pour l'opportunité qu'il m'a offerte de participer aux nombreux projets de recherche, pour ces conseils précieux et sa contribution à mes articles scientifiques.

Je remercie également à ma co-directrice de thèse, le Professeur Chantal Housset, d'avoir accepté de m'accueillir dans son équipe et de m'avoir apporté son aide précieuse, pour tous les conseils dans la rédaction de cette thèse et des articles scientifiques.

Je remercie profondément les Professeurs Jean Michel Oppert, Eric Nguyen-Khac et Vincent Mallet, ainsi que aux Docteurs Lawrence Serfaty et Jérôme Boursier, qui m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Je remercie toute équipe du Service d'Hépato-gastro-entérologie du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, pour l'accueil et pour l'aide durant toutes ces années.

Je remercie spécialement à mes amies doctorants Hugo Perazzo, Fabio Nascimbeni et Raluca Pais pour la collaboration aux plusieurs projets de recherche que nous avons entrepris ensemble, pour votre aide aux moments les plus difficiles, vos conseils précieux et votre amitié.

Enfin, je tiens à remercie du fond du cœur mes parents qui m'ont donné la liberté de suivre mes rêves et de faire ce que j'aime, pour leur soutient permanent et leur encouragements.

En particulier, ma famille et mes amis proches, tous ceux qui m'ont entouré et soutenu sur le plan humain, tout au long de ce passionnant parcours scientifique.

Liste des Abréviations

A2M: Alpha-2-macroglobuline

AASLD: Association for the Study of Liver Diseases

ALAT: alanine aminotransférase

Apo-A1: Apolipoprotrèine-A1

ASAT: aspartate aminotransférase

AUROC: area under the receiver operating characteristic curve

CAP: Controlled Attenuated Parameter

CBP: cirrhose biliaire primitive

CHC : carcinome hépatocellulaire

CK-18: cytokératine 18

EASL: European Association for the Study of Liver Diseases

ELF: European Liver Fibrosis score

FLI: Fatty Liver Index

GGT: gamma glutamil transférase

GPVH: Gradient de pression veineuse hépatique

GWAS: genome-wide association study

HbA1c: hémoglobine glyquée

HOMA: Homeostasis Model Assessment

HR: Hazard ratio

HSI: Hepatic Steatosis Index

IC: Intervalle de confiance

IL-6 : Interleukine 6

IL-8: Interleukine 8

IMC: indice de masse corporelle

IQR: Inter-quartil range

IRM: Imagerie par résonance magnétique

k: Kappa

kPa: Kilopascals

LAP : Lipid accumulation product

MRS : Spectroscopie par résonance magnétique

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease

NAFLD-LFS: NAFLD Liver Fat score

NAS: NAFLD activity score

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

PBH: Ponction biopsie hépatique

PNPLA3: Patatin-like phospholipase domain containing 3

SAF: Steatosis Activity Fibrosis

Se: Sensibilité

SOPK: Syndrome des ovaires polykystiques

Sp: Spécificité

TDM: Tomodensitométrie

TdR: Taux de réussite

TNF-α: Facteur de nécrose tumorale alpha

TyG : Triglycerides x Glucose

VAI: Visceral Adiposity Index

VHB: Virus de l'hépatite B

VHC: Virus de l'hépatite C

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VO: Varices œsophagiennes

wAUROC: weighted AUROC

Résumé

La stéatose hépatique non alcoolique, regroupant la stéatose isolée (NAFLD) et la stéatohépatite non-alcoolique (NASH), est un enjeu de santé publique mondial en raison d'une incidence croissante, en grande partie expliquée par l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité. La stéatose hépatique prédit la survenue des complications métaboliques associées à l'insulinorésistance, comme le diabète ou les événements cardiovasculaires.

La connaissance de l'histoire naturelle de la NAFLD comporte encore de nombreuses incertitudes. Actuellement le modèle explicatif repose sur une dichotomie entre la stéatohépatite (NASH), qui peut progresser vers la cirrhose et la stéatose isolée ou avec inflammation minime (NAFL) qui jusqu'à présent était considérée comme une condition non évolutive ne progressant pas vers la cirrhose et n'augmentant pas la morbi-mortalité d'origine hépatique. Cette dichotomie conditionne en grande partie la prise en charge de ces patients, ceux avec NAFL étant souvent rassurés par le praticien quant à leur devenir et ne bénéficiant pas d'une surveillance hépatique spécifique.

La ponction biopsie du foie est considérée comme un examen de référence, mais son usage en pratique clinique reste limité en raison d'effets indésirables, d'erreurs d'échantillonnage et de la variabilité d'interprétation inter-observateur. Les méthodes non invasives de lésions hépatiques sont devenues une vraie alternative à la biopsie du foie pour la prise en charge des patients ayant une maladie chronique du foie, au cours des dix dernières années.

Les objectifs de cette thèse étaient: 1) de mieux comprendre l'évolution histologique de la maladie et de définir la corrélation entre les changements histologiques et les co-morbidités métaboliques; 2) d'identifier les facteurs déterminant la variabilité des valeurs d'élastométrie à court terme chez les patients atteints d'une maladie chronique du foie; 3) de définir la performance diagnostique et les limitations de certains marqueurs non-invasifs de stéatose chez les patients atteints d'une NAFLD prouvée histologiquement.

1. Le travail réalisé a permis de montrer que bon nombre de patients présentant une NAFL peuvent en fait progresser vers la stéatohépatite, parfois avec fibrose avancée. Une inflammation lobulaire ou une fibrose, même minimes, augmentent le risque de progression histologique à moyen terme, comparativement à la stéatose isolée dont la progression reste très faible. Souvent cette progression histologique s'accompagnait d'une aggravation des facteurs cardio-métaboliques au cours du suivi. Ces données, si confirmées, permettent une meilleure stratification du risque évolutif et, partant, un changement des pratiques actuelles de prise en charge des sujets avec stéatose mais sans stéatohépatite.

2. Nos données montrent que les mesures successives d'élastométrie peuvent avoir une variabilité substantielle et qui n'est pas nécessairement liée à l'évolution de la fibrose. Cette variabilité de la rigidité hépatique est un phénomène général survenant à tous les stades de fibrose et non limitée aux patients atteints de fibrose avancée; elle est cependant plus élevée pour une élastométrie > 7 kPa. Nous avons identifié certains facteurs conditionnant la variabilité des valeurs d'élastographie indépendamment de changements réels du stade de fibrose hépatique. L'évaluation par différents opérateurs et/ou des opérateurs moins expérimentés était un facteur prédictif majeur, ainsi qu'un rapport IQR/M élevé. L'IMC a été associé de manière systématique à la discordance des examens successifs. Même une faible élévation du taux d'ALT (deux fois la normale) a un impact non-négligeable sur la capacité diagnostique d'élastographie.

3. Nous avons analysé cinq marqueurs de stéatose (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI et TYG) chez des patients suspects de NAFLD et ayant eu une biopsie du foie. Tous ces marqueurs sont capables de diagnostiquer la présence d'une stéatose hépatique (0-5% vs ≥5%) avec une bonne performance diagnostique. De plus ils étaient corrélés, positivement au degré d'insulinorésistance mesuré par le score de HOMA. Cependant, aucun marqueur, n'a pu distinguer entre la stéatose modérée et sévère (33-66% vs >66%) ce qui ne permet pas de les utiliser pour la quantification de la stéatose. La fibrose hépatique et l'inflammation ont été identifiées comme des facteurs confondants importants de la relation entre les valeurs de ces marqueurs et la stéatose histologique.

Cette étude a également démontré pour la première fois l'association entre deux marqueurs de stéatose (le VAI et le score TyG) et l'insulinorésistance dans une cohorte de patients atteints d'une NAFLD histologiquement prouvée. Cela confirme le lien physiopathologique existant entre l'adiposité viscérale, l'insulinorésistance et la stéatose hépatique.

Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) covers a spectrum ranging from isolated steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and is becoming one of the most frequent causes of chronic liver disease, mainly because of its close association with the worldwide epidemic of diabetes and obesity. Liver steatosis can predict the occurrence of metabolic complications associated with insulin resistance, such as diabetes and cardiovascular events.

Our understanding of the natural history of NAFLD is still incomplete. Currently, the explicative model is based on a dichotomy between steatohepatitis, considered the progressive form of the disease, which can lead to cirrhosis and isolated steatosis with or without minimal inflammation, which is considered a non-progressive condition that does not impact overall survival or result in liver-related mortality and morbidity. This dichotomy largely determines the management of NAFLD patients: patients without steatohepatitis usually do not undergo specific monitoring for liver disease progression.

Liver biopsy is considered the reference diagnostic method but its implementation in clinical practice remains limited due to procedure complexity, invasiveness, cost, potential complications, sampling error and inter-observer variability. Non-invasive methods of hepatic injury have become a real alternative to liver biopsy for the diagnosis of patients with chronic liver disease in the past decade.

The aims of this thesis were: 1) to better understand the histological course of the disease, to better identify patients at risk of histological progression based on initial histological findings and to establish a correlation between histological changes and the course of metabolic co-morbidities often associated with NAFLD; 2) to establish factors associated with short-term variability of repeated measurements of elastometry in patients with chronic liver diseases in order to understand how this non invasive procedure can be used for patient monitoring 3) to determine the diagnostic value and limitations of several steatosis biomarkers using liver biopsy as a reference standard in a large cohort of patients with suspected NAFLD.

1. Our study shows that a fraction of patients with isolated steatosis can unambiguously evolve towards well-defined steatohepatitis, and in some of them, bridging fibrosis. The presence of mild lobular inflammation or any amount of fibrosis substantially increases the risk of histological progression in the mid-term while those with steatosis alone are at lowest risk. Patients with disease progression experienced a deterioration of cardio-metabolic risk factors.

Our data if validated by independent studies, allow for better stratification of patients at risk of disease progression. The results of this study favor a change in the practices of monitoring and risk assessment of patients with steatosis but without steatohepatitis.

2. The data we generated demonstrate a substantial variability of repeated, short-term, transient elastometry measurements, in patients with chronic liver diseases; this variability is not due to changes in liver fibrosis. The analytical variability of liver stiffness measurements occurs at all stages of fibrosis and is not limited to patients with advanced fibrosis. Patients with stiffness values higher than 7 kPa are at highest risk of non-fibrosis related LSM variability. We have identified some factors affecting the variability of elastometry values regardless of actual changes in the stage of liver fibrosis. The most important determinants of discordant TE readings between successive examinations were: the evaluation by different operators and/or less experienced operators, a higher IQR/M ratio changes in BMI and increases in ALT (including small changes such as the doubling of baseline values).

3. In this study we analyzed five biomarkers of steatosis (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI and TyG) in a large cohort of biopsy-proven NAFLD patients. We show that all five biomarkers of steatosis are able to discriminate between the absence and the presence of steatosis (0-5% vs $\geq$5%) with an overall good diagnostic performance. Moreover, all the biomarkers correlated with insulin resistance, measured by the HOMA score. However, these biomarker panels are insufficiently accurate for the quantification of steatosis, none of them distinguished between moderate and severe steatosis (33-66% vs. >66%). Unexpectedly, fibrosis and inflammation were important confounders of the relation between liver fat and the steatosis biomarkers. The current study reports for the first time on the association between two surrogate markers of insulin resistance, the VAI and the TyG index, and histologically defined hepatic steatosis in an homogenous population of NAFLD patients. This confirms the pathophysiological link existing between visceral adiposity, insulin resistance and hepatic steatosis.

Liste des publications en rapport avec la thèse :

- Article 1. Article Original, publié en Septembre 2013 - **Journal of Hepatology - IF: 9.5**

A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver.

Raluca Pais, Fréderic Charlotte, Larysa Fedchuk, Pierre Bedossa, Pascal Lebray, Thierry Poynard, Vlad Ratziu, for the LIDO Study Group. Journal of Hepatology 2013 Sep; 59(3):550-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.027.

- **Article 2**. Accepté, **Clinical Gastroenterology and Hepatology- IF: 6.648**

Clinically significant variability of elastometry on short-term follow-up in patients with chronic liver diseases.

Fabio Nascimbeni, Pascal Lebray, Larysa Fedchuk, Claudia P. Oliveira, Mario Reis Alvares-da-Silva, Anne Varault, Patrick Ingiliz, Yen Ngo, Mercedes de Torres, Mona Munteanu, Thierry Poynard, Vlad Ratziu, for the LIDO Study Group.

- Article 3. Accepté**, Alimentary Pharmacology & Therapeutics- IF: 5.478**

Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease.

Larysa Fedchuk, Raluca Pais, Frederic Charlotte, Chantal Housset, Vlad Ratziu for the LIDO Study Group.

- Article annexe: Article Original, publié en Janvier 2011 - **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology – IF: 1.348**

Raluca Pais, Alina Pascale, Larysa Fedchuck, Fréderic Charlotte, Thierry Poynard, Vlad Ratziu**.** "Progression from isolated steatosis to steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease".Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2011 Jan; 35(1):23-8.

Objectifs de la thèse

La stéatose hépatique non alcoolique est devenue l'une des maladies hépatiques les plus fréquentes dans le monde due à son incidence croissante, en grande partie expliquée par l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité. Dans la population générale la prévalence de la NAFLD, diagnostiquée par échographie, est estimée à 20-30% en Europe. Certaines patients présentent un risque plus élevé : les patients diabétiques (50 à 70%), les patients ayant une dyslipidémie (50%) et les patients obèses morbides (jusqu'à 90%).

La biopsie du foie est le seul moyen pour évaluer les lésions tissulaires hépatiques et déterminer le stade de la fibrose. Cependant, la biopsie est un examen invasif, coûteux, nécessitant une hospitalisation, non exempt de complications et de certaines limitations comme la variabilité intra-observateur et les erreurs d'échantillonnage. Les méthodes non invasives d'évaluation des lésions hépatiques sont devenues une vraie alternative à la biopsie du foie pour la prise en charge des patients ayant une maladie chronique du foie, au cours des dix dernières années. Les méthodes non invasives permettent de faciliter le dépistage des patients à risque et d'assurer le suivi des patients atteints d'une NAFLD/NASH.

Les objectifs principaux de cette thèse étaient de mieux comprendre l'histoire naturelle de NAFLD et de définir la place des méthodes non invasives chez les patients ayant une maladie chronique du foie, en particulier la NAFLD. Pour atteindre ces objectifs nous avons réalisé, dans un premier temps, une étude chez les patients atteints de la NAFLD avec des biopsies hépatiques de suivi afin de mieux comprendre l'évolution histologique de cette maladie.

Nous avons ensuite réalisé une étude sur la variabilité des valeurs d'élastométrie à court terme chez les patients atteints d'une maladie chronique du foie. La dernière étude a évalué la performance diagnostique et les limitations de certains marqueurs non-invasifs de stéatose chez les patients atteints d'une NAFLD prouvée histologiquement.

CHAPITRE I. Stéatose hépatique non-alcoolique

I-1. **Définition**.

La stéatose hépatique non-alcoolique (équivalent du terme anglais *non alcoholic fatty liver disease* [NAFLD]) englobe un spectre allant de la stéatose hépatique simple (en anglais *nonalcoholic fatty liver* [NAFL]) jusqu'à la stéatohépatite non alcoolique (équivalent du terme anglais *nonalcoholic steatohepatitis* [NASH]) et la cirrhose (Angulo 2002; Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003; Adams, Lymp et al. 2005; Kotronen, Westerbacka et al. 2007).

La NAFLD est caractérisée par une accumulation intra-hépatique excessive de graisses (stéatose), qui peut être isolée ou associée à une inflammation hépatique non-spécifique. La NASH est la forme progressive de NAFLD et elle est définie par l'association d'une stéatose dans plus que 5% des hépatocytes à une inflammation lobulaire et à des lésions de souffrance hépatocytaire (ballonnisation)(Adams, Angulo et al. 2005), (Kleiner, Brunt et al. 2005) (Brunt 2010).

La stéatose simple touchant entre 1 et 5% des hépatocytes est considérée comme physiologique et elle est une évolution bénigne, alors que la NASH est définie par une atteinte hépatocytaire, l'inflammation et/ou une fibrose qui peut conduire à la cirrhose, l'insuffisance hépatique et le carcinome hépatocellulaire (Vanni, Bugianesi et al.).

Historiquement, le diagnostic nécessite l'exclusion des autres causes d'hépatopathie chronique (virale, auto-immune, génétique, toxicité médicamenteuse…) et une consommation quotidienne d'alcool inférieure ou égale à 20 g/j chez la femme ou 30 g/j chez l'homme (Ratziu, Bellentani et al.). Certaines études épidémiologiques ont démontré que le risque d'induction de la stéatose par l'alcool devient significatif au-delà de ces seuils (Bellentani, Saccoccio et al. 2000).

Dans la majorité des cas, chez un patient adulte, la NAFLD et la NASH sont associées à une insulinorésistance et ses complications phénotypiques, essentiellement les affections faisant partie du syndrome métabolique: le diabète de type 2, l'obésité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie (Marchesini, Brizi et al. 2001; Adams, Angulo et al. 2005; Ratziu, Bellentani et al.), (Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003).

A présent, la NAFLD est considérée comme la manifestation hépatique de syndrome métabolique (Marchesini, Brizi et al. 2001) (Marchesini, Brizi et al. 1999) (Smith and Adams 2011) (Gastaldelli).

I-2. **Description originelle.**

Pour la première fois, la NASH a été décrite par Ludwig et al en 1980, décrivant une maladie hépatique chronique avec des lésions histologiques similaires à celles de la maladie alcoolique du foie mais chez 20 patients sans consommation d'alcool excessive (<30g/j chez l'homme et <20g /j chez la femme).

La biopsie hépatique retrouvait une stéatose macrovésiculaire allant de modérée à sévère avec une inflammation lobulaire, de corps de Mallory, la fibrose périsinusoïdale et la cirrhose. Ludwig a divisé les patients selon l'étiologie de la NASH en deux groupes : les causes primaires (obésité) et secondaires (digestives, médicamenteuses, etc.) (Ludwig, Viggiano et al. 1980).

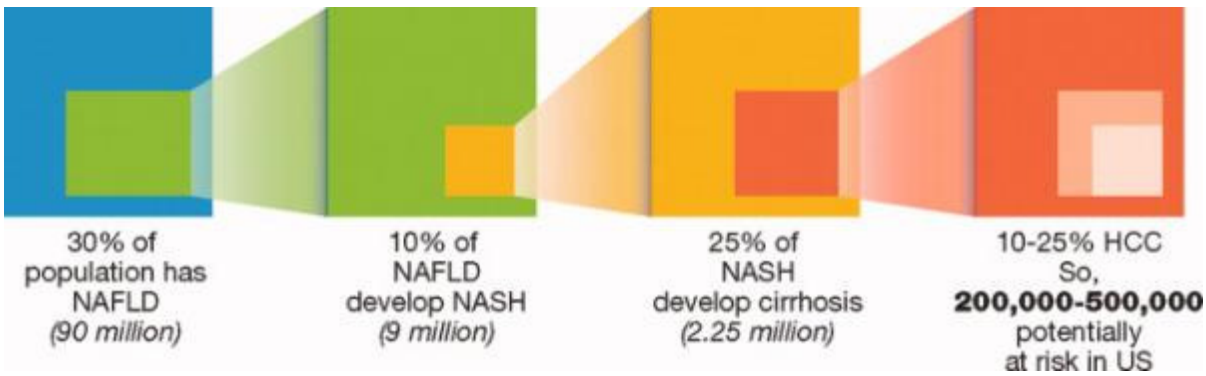
L'affection que Ludwig et al. ont appelé « la stéatohépatite non alcoolique » est devenue 30 ans plus tard l'une des maladies hépatiques les plus fréquentes dans le monde. La NASH touche actuellement de 3 à 5% de la population générale (Vernon, Baranova et al. 2011).

I-3. **Epidémiologie**.

Avec l'augmentation croissante de l'obésité et du syndrome métabolique, la NAFLD est devenue un des problèmes de santé publique les plus importants à travers le monde (Browning, Szczepaniak et al. 2004), qui est responsable d'une augmentation des dépenses directes et indirectes de santé de 26% en 5 ans (Baumeister, Volzke et al. 2008).

La prévalence reportée de la NAFLD et plus particulièrement de la NASH varie beaucoup en fonction de la population étudiée. (Figure 1)

Figure 1. Relation entre NAFLD, NASH et CHC. (Abby B. Seigel Cancer Dec 15, 2009 115(24) 5651-5661.)



La NAFLD est présente dans environ 70% des cas d'élévation asymptomatique des transaminases aux Etats-Unis (Clark, Brancati et al. 2003). La prévalence de la NAFLD dans le monde entier varie de 6.3% à 33% dans la population générale en fonction de la méthode diagnostique utilisée (Chalasani, Younossi et al.), 5.4% à 24% (Clark 2006), Dans les pays industrialisés elle se situe entre 20 et 40% (Bedogni, Miglioli et al. 2005).

La prévalence de la NAFLD chez les patients diabétiques varie entre 50 et 70% (Anstee, Targher et al. 2013), (Targher, Bertolini et al. 2007), (Williamson, Price et al. 2011) et elle augmente jusqu'à 90% chez les patients obèses morbides ayant subi une chirurgie bariatrique (Boza, Riquelme et al. 2005). (Vernon, Baranova et al. 2011) (Machado, Marques-Vidal et al. 2006) (Beymer, Kowdley et al. 2003). Un patient sur deux (jusqu'à 50%) ayant une dyslipidémie présente la NAFLD (Assy, Kaita et al. 2000).

La stéatose est observée chez la majorité des malades obèses (60 à 75 %), diabétiques (21 à 78 %) et avec hypertriglycéridémie (50 %). La NASH est observée chez environ 20 % des malades obèses (Dixon, Bhathal et al. 2001) et chez 3% des malades avec un poids normal.

La prévalence de la NAFLD augmente chez les sujets âgés, surtout chez les hommes entre 40 et 65 ans (Frith, Day et al. 2009) (Powell, Cooksley et al. 1990). La prévalence de la NAFLD varie selon l'origine ethnique, affectant ~ 45% des Hispaniques, 33% des Caucasiens et 24% de Afro-Américains. Chez les Caucasiens, la NAFLD est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes, mais il n'y a pas cette différence chez les Afro-Américains et les Hispaniques (Browning, Szczepaniak et al. 2004; Weston, Leyden et al. 2005; Angulo 2007).

La prévalence de la NASH dans la population générale a été estimée de 3 à 5%. (Vernon, Baranova et al. 2011). Les études récentes dans des services spécialisés d'Hépato-gastroentérologie confirment une prévalence élevée de la NASH: 43-55% (de Ledinghen, Ratziu et al. 2006) (Soderberg, Stal et al. 2010) chez les sujets ayant une augmentation des transaminases, 49% des patients souffrant d'obésité morbide (Newton, Jones et al. 2008; Feldstein, Charatcharoenwitthaya et al. 2009) et 67% dans un sous-groupe de patients chez lesquels une hépatopathie chronique est découverte de façon fortuite (Adams, Angulo et al. 2005).

Chez les sujets considérés comme sains c'est à dire sans exposition connue à des facteurs de risque de maladie chronique du foie, comme les donneurs vivants pour la greffe de foie, la NASH a été diagnostiquée dans 3-16% des cas en Europe (Minervini, Ruppert et al. 2009) (Nadalin, Malago et al. 2005) et 6-15% des cas aux Etats-Unis (Ryan, Johnson et al. 2002) (Tran, Changsri et al. 2006).

I-4. Facteurs de risque.

La prévalence de la stéatose métabolique augmente avec l'âge, et est plus élevée chez les hommes entre 40 et 65 ans (Powell, Cooksley et al. 1990) (Frith, Day et al. 2009) et chez les sujets d'ethnie latino-américaine mais plus faible chez les Afro-Américains (Browning, Szczepaniak et al. 2004; Weston, Leyden et al. 2005).

Un lien de parenté direct avec un patient porteur d'une stéatose constitue également un facteur de risque, indépendant de l'âge et de l'index de masse corporelle (IMC) (Schwimmer, Celedon et al. 2009; Wagenknecht, Scherzinger et al. 2009).

Les études d'association pangénomique (en anglais *genome-wide association study; GWAS*), ont démontré que le variant génétique I148M de l'adiponutrine ou PNPLA3 (en anglais *Patatin-like phospholipase domain containing 3*) est un marqueur potentiel de la stéatose hépatique. Son expression est associée à une augmentation des triglycérides chez les patients ayant une stéatose hépatique non alcoolique (Anstee and Day 2013).

Alors que les causes secondaires de NASH sont exceptionnelles, la forme la plus fréquente est celle survenant chez des patients présentant une insulinorésistance associée au surpoids, à l'obésité, à l'adiposité viscérale, au diabète de type 2, à la dyslipidémie et à l'hypertension artérielle (Marchesini, Brizi et al. 1999) (Marchesini, Brizi et al. 2001; Marchesini, Bugianesi et al. 2003).

La stéatose hépatique est assez souvent associée à l'hépatite C, en particulier le génotype 3, et des troubles endocriniens tels que le syndrome des ovaires polykystiques (Setji, Holland et al. 2006; Cerda, Perez-Ayuso et al. 2007), une insuffisance hypophysaire (Adams, Feldstein et al. 2004) et une hypothyroïdie (Loria, Carulli et al. 2009).

I-5. Histoire naturelle

L'histoire naturelle ainsi que la prévalence exacte dans la population générale de la NAFLD/NASH est mal connue en raison de l'absence des études prospectives.

Les patients avec une NAFLD/NASH ont un risque de mortalité plus élevé que la population générale. La surmortalité repose essentiellement sur l'augmentation des événements cardiovasculaires et hépatiques (Adams, Lymp et al. 2005) (Ekstedt, Franzen et al. 2006). Les patients ont entre 4,4 (Dunn, Xu et al. 2008) et 13,6 fois plus de risques cardiaques (Feldstein, Charatcharoenwitthaya et al. 2009). En effet, les patients atteints de la NAFLD ont une athérosclérose (mesurée par l'épaisseur du média de l'artère carotide) plus sévère que les patients

sans stéatopathie (Targher, Day et al. 2010).

Les études épidémiologiques indiquent que, contrairement à la simple stéatose, la NASH est associée à une mortalité hépatique 10 fois plus élevée (2,8% vs 0,2%, respectivement) et un risque multiplié par deux de décès cardiovasculaire par rapport à une population générale (15,5% vs 7,5%, p = 0,04 pour les deux)(Ekstedt, Franzen et al. 2006). 5,4% des patients atteints de NASH développent des complications de la maladie hépatique au stade terminal. (Argo and Caldwell 2009) (Ekstedt, Franzen et al. 2006; Ratziu, Bellentani et al. 2010).

Les patients avec stéatose simple évoluent pas ou peu vers la cirrhose à 10 ans (environ 2 % de cirrhose à 9 ans) (Figure 2). La stéatose simple est actuellement considérée comme d'évolution bénigne (Powell, Cooksley et al. 1990) (Teli, James et al. 1995). Toutefois, la présence d'une stéatose est un facteur aggravant s'il existe d'autres causes d'agression hépatique comme l'alcool (Ekstedt, Franzen et al. 2009) ou les virus d'hépatite B ou C (Bedossa, Moucari et al. 2007). La NASH est responsable de l'apparition d'une fibrose hépatique et de cirrhose (15 % à 5 ans)(Neuschwander-Tetri and Caldwell 2003) pouvant se compliquer de carcinome hépatocellulaire (Bugianesi, Leone et al. 2002). D'après les données rétrospectives, dans 4%-27% des patients ayant une cirrhose du à la NASH sont à risque d'avoir le CHC (Ratziu, Bonyhay et al. 2002).

La progression vers la cirrhose est plus importante en cas d'activité cytolytique significative. Ainsi, la perturbation des transaminases au cours du suivi reflète l'activité de la maladie et son évolutivité vers la fibrose (Adams, Sanderson et al. 2005). Actuellement, la perte de poids et la diminution du tour de taille sont identifiées comme des facteurs protecteurs contre l'aggravation histologique (Wong, Wong et al. 2010).

Plusieurs études ont suggéré que la cirrhose secondaire à une NASH représenterait la principale cause des cirrhoses dites cryptogénétiques (Caldwell, Oelsner et al. 1999) Il existe jusqu'à 10% de cirrhose au moment du diagnostic de NASH (Adams, Sanderson et al. 2005). Les lésions histologiques sont nettement moins marquées avec une diminution de la stéatose et des lésions nécrotico-inflammatoires, aboutissant à un tableau de cirrhose non active, d'étiologie indéterminée. C'est grâce à l'association entre les facteurs de risque, les caractéristiques cliniques et anatomopathologiques que la cirrhose NASH peut être diagnostiquée.

La médiane de survie de 48 % à 10 ans des patients avec une cirrhose NASH est similaire, voire supérieure aux patients avec une cirrhose virale C active. Les patients avec une cirrhose NASH ont toutefois une mortalité cardiovasculaire plus importante (Sanyal, Banas et al. 2006). La première décompensation survient, en médiane, 7 ans après le diagnostic de NASH.

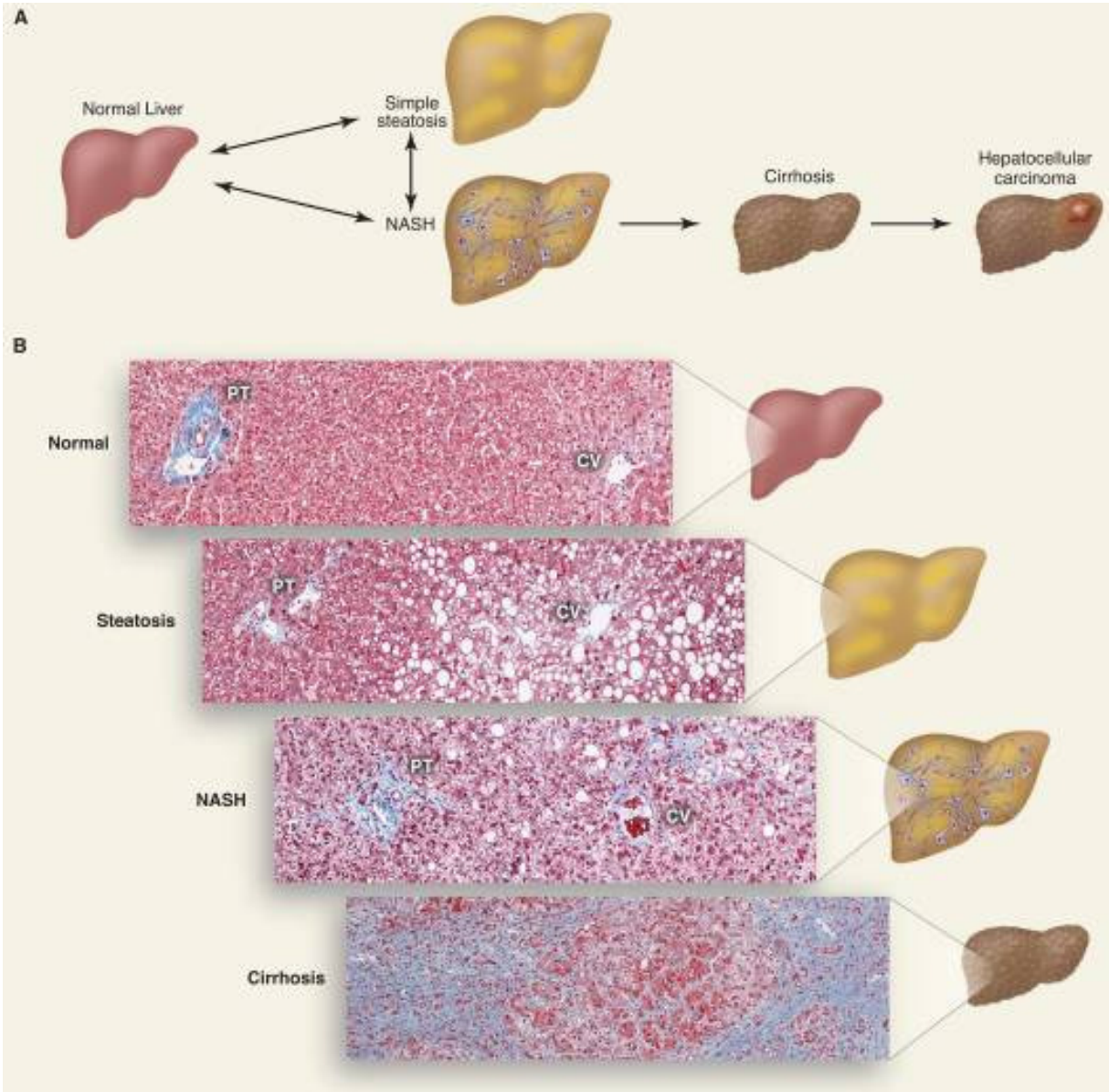
Par contre l'incidence du CHC semble plus faible qu'au cours de la cirrhose virale C. Les facteurs risques de CHC sur cirrhose NASH sont : la durée d'évolution du diabète et l'obésité.

Figure 2. Le spectre pathologique de NAFLD.

A. Le schéma de progression de la NAFLD.

B. L'histologie du foie sain, de la stéatose, de la NASH et de la cirrhose.

(*PT* – la triade portale, *CV* – la veine centrale).

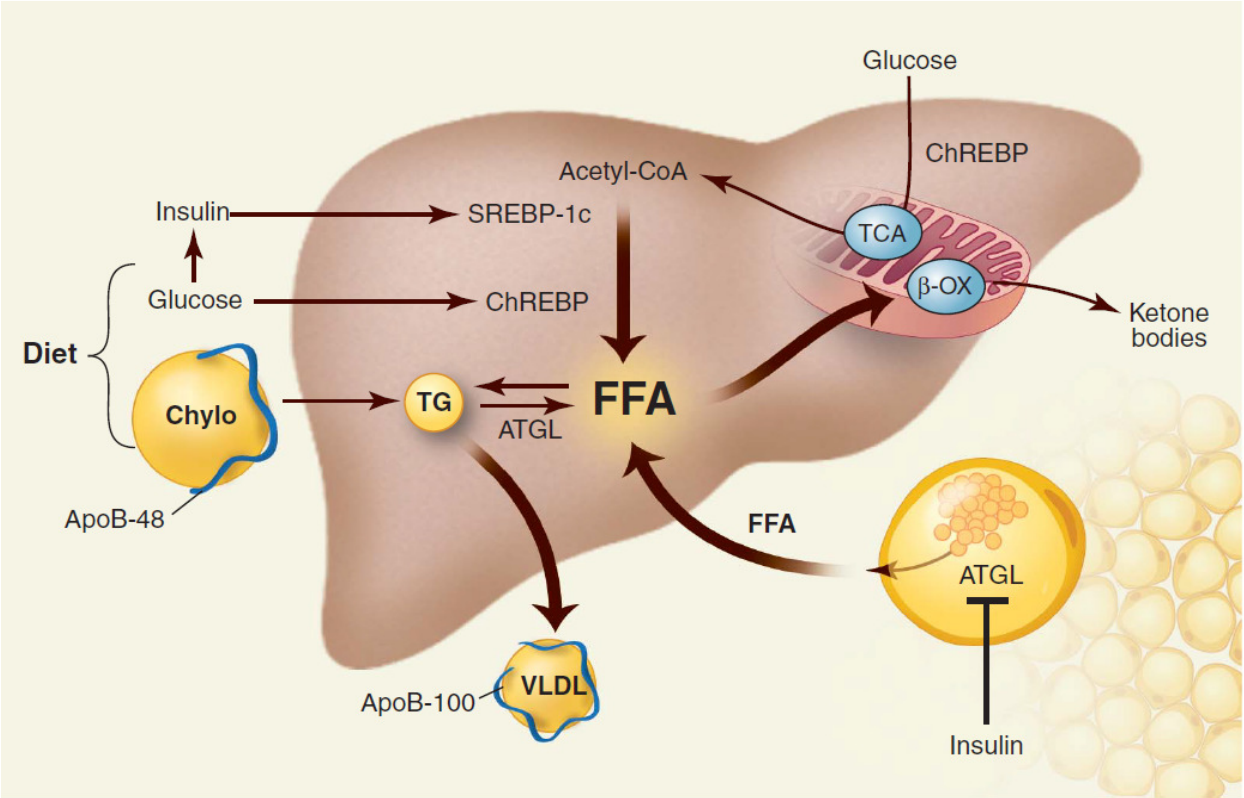


(D'après Cohen JC et al. Science. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23).

***I-6.* Pathophysiologie**.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques pourraient être à l'origine de la NAFLD. L'hypothèse des "*multi-hit*" (initialement "*double-hit*") est la théorie la plus connue pouvant expliquer la pathogenèse de la NAFLD. Le premier hit favorise la stéatose alors que de multiples autres hits favorisent l'apparition des lésions nécrotico-inflammatoires et la progression de la fibrose (Figure 3).

Figure 3. La pathophysiologie de la NAFLD.



D'après Cohen JC et al. Science. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23.

La stéatose est le résultat d'un déséquilibre entre la synthèse d'acides gras et leur dégradation. Plusieurs événements concourent à l'accumulation de triglycérides dans le foie : l'afflux d'acides gras secondaire à une augmentation de la lipogenèse (synthèse de novo d'acides gras), le relargage d'acides gras par la lipolyse adipocytaire, l'altération de leur exportation sous forme des lipoprotéines de très basse densité et de leur oxydation mitochondriale et peroxysomale.

L'insulinorésistance entraîne une accumulation intrahépatique des acides gras libres, diminue la signalisation de l'insuline dans le muscle strié, augmente la production intrahépatique de glucose et favorise la néoglucogenèse ("first hit"). En présence d'une stéatose hépatique, l'activation d'une cascade inflammatoire associée à une interaction complexe entre les hépatocytes, le tissu adipeux, les cellules étoilées du foie et les cellules de Kupffer entraîne une progression vers la stéatohépatite (plusieurs "*second hits*") (Day and James 1998; Jou, Choi et al. 2008).

A présent, la pathogenèse de la NAFLD n'est pas bien connue et tous les mécanismes favorisant le passage de la stéatose simple à la stéatohépatite n'ont pas été identifiés.

L'interaction complexe entre adipokines et cytokines produites par les adipocytes et/ou les cellules inflammatoires infiltrant le tissu adipeux semble jouer un rôle crucial dans le syndrome métabolique et la NAFLD.

Les médiateurs inflammatoires ont également un rôle important dans le développement de la NASH. La quantité des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le facteur nucléaire kappa beta (*NF-kB*) (Videla, Tapia et al. 2009) est plus augmenté chez les patients ayant une NASH. De plus, la présence de protéines pro-inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) peuvent être impliqués dans la pathogénèse de la stéatose métabolique. Les patients obèses ayant une insulinorésistance ont des concentrations de TNF-α plus élevés que les non-obèses (Hotamisligil, Arner et al. 1995). Les concentrations de TNF-α sont corrélés à la sévérité de l'inflammation et de la fibrose hépatique (Crespo, Cayon et al. 2001) (Abiru, Migita et al. 2006).

L'adiponectine joue un rôle important dans la régulation des acides gras en inhibant la gluconéogenèse hépatique (Yamauchi, Kamon et al. 2002). La concentration d'adiponectine, inversement corrélé à la quantité de tissus adipeux, est réduite chez les patients obèses (Lafontan and Viguerie 2006). Les taux bas d'adiponectine semblent être associés à une inflammation hépatique plus sévère (Targher, Bertolini et al. 2006) tandis que l'administration d'adiponectine améliore l'inflammation et la stéatose dans les modèles animaux (Xu, Wang et al. 2003).

L'alimentation est un facteur important de développement de la NAFLD, principalement parce que la consommation déséquilibrée d'aliments très énergétiques conduit à l'obésité et à son tour augmente le risque de NAFLD. Cependant, non seulement la quantité, mais aussi la qualité d'alimentation pourraient jouer un rôle important pour le développement et la

progression de la NAFLD. Les régimes riches en acides gras saturées et en cholestérol et pauvres en acides gras polyinsaturés, en fibres et en vitamines antioxydantes C et E (Musso, Gambino et al. 2003) ont été associés à la NASH.

Le microbiote intestinal peut être aussi impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD de plusieurs façons, en provoquant la prédisposition à l'obésité, l'induction de l'insulinorésistance et/ou l'inflammation hépatique (Abu-Shanab and Quigley 2010).

Chez des patients atteints de NAFLD, une altération de la perméabilité intestinale semble être corrélée à la sévérité de la stéatose et à la prévalence du syndrome métabolique (Miele, Valenza et al. 2009). Ça peut être du à la peroxydation lipidique et le stress oxydatif intestinal qu'il induit, l'hyperinsulinémie et les taux élevés de cytokines pourraient être impliqués dans l'altération de la barrière muqueuse.

Le microbiote intestinal altéré chez les patients atteintes de la NASH peut provoquer une augmentation de la production d'éthanol intestinale, ce qui, lié à la perméabilité intestinale augmentée pourrait conduire à une exposition accrue de foie à l'éthanol et ses métabolites toxiques, les espèces réactives de l'oxygène et l'endotoxine bactérienne, tous qui peut ainsi favoriser l'inflammation du foie (Goel, Gupta et al. 2014).

*I-7. D*iagnostic.

La majorité des patients atteints de NAFLD sont asymptomatiques ou présentent des symptômes non spécifiques, comme une fatigue ou une douleur de l'hypocondre droit.(Day 2011). La maladie peut être suspectée par la mise en évidence d'une anomalie des tests hépatiques ou par la mise en évidence (souvent fortuite) à l'échographie abdominale d'une stéatose hépatique. Les patients cirrhotiques d'origine de NAFLD ont les symptômes typiques d'hépatopathie chronique comme les angiomes stellaires, une circulation collatérale, un ictère ou une ascite.

Le diagnostic de NAFLD nécessite l'exclusion d'autres causes de maladie hépatique, comme une consommation excessive d'alcool, une prise chronique de traitement hépatotoxique ou les hépatites (virales, auto-immune, médicamenteuse), une lipodystrophie, une hémochromatose ou une maladie de Wilson, les troubles alimentaires (malnutrition, nutrition parentérale, perte de poids rapide) (Dowman, Tomlinson et al. 2011) (Adams and Feldstein 2011).

Une élévation des transaminases (ALAT) et d'aspartate aminotransférase (ASAT) e (Pratt and Kaplan 2000; Adams and Feldstein 2011) et présente chez environ 50% des patients atteints de stéatose simple et chez 80% des patients ayant une NASH (Yan, Durazo et al. 2007). Néanmoins une proportion significative de sujets peuvent avoir des transaminases normales(Adams, Angulo et al. 2005). De même il a été suggéré qu'un rapport AST:ALT supérieur à 1,0 était évocateur d'une fibrose avancée (Angulo, Keach et al. 1999).

Parmi les causes acquises de stéatose, la première cause qui doit être écartée est l'origine alcoolique. Le seuil de consommation excessive d'alcool varie en fonction des études (Liangpunsakul and Chalasani 2012). On retient habituellement les seuils de 21 unités d'alcool (~30g/jour) par semaine pour les hommes et 14 unités (~20g/jour) par semaine pour les femmes (Sanyal, Brunt et al. 2011). Le virus de l'hépatite C de génotype 3 a été identifié comme stéatogénique, ce qui n'est pas le cas des autres génotypes (Goossens and Negro 2013).

Différents médicaments ont été identifiés comme inducteurs de stéatose : les corticoïdes, l'amiodarone, le tamoxifène ou les nouveaux anti-rétroviraux.

La NAFLD secondaire a été décrite chez les patients exposés aux certains toxines : des champignons *Amanita phalloides*, de *Bacillus cereus*, de phosphore et de pétrochimie (Kneeman, Misdraji et al. 2012).

Certaines maladies génétiques rares peuvent également être à l'origine de la NAFLD secondaire, comme l'abêtalipoprotéinémie, l'hypoalphalipoprotéinémie familiale, l'hyperlipidémie familiale combinée, la maladie de Weber-Christian ou les maladies auto-immune comme une intolérance au gluten (Kneeman, Misdraji et al. 2012).

Selon les dernières recommandations établies par l'association américaine des hépatologues (*AASLD*) (Chalasani, Younossi et al.2012), le diagnostic de NAFLD peut être retenu lorsque les quatre conditions suivantes sont remplies: 1. la stéatose hépatique confirmé par l'imagerie ou la biopsie; 2. La consommation d'alcool <210 g/semaine pour les hommes et <140 g/semaine pour les femmes; 3. L'absence d'autres facteurs induisant la stéatose du foie ; 4. L'absence d'autres causes d'une maladie chronique du foie.

I-7-1. **Ponction Biopsie Hépatique (PBH)**.

La biopsie hépatique reste actuellement le seul moyen diagnostic de la stéatohépatite. Ceci est basé sur l'association de trois lésions : la stéatose macrovésiculaire dans >5% des hépatocytes, l'inflammation lobulaire et la ballonisation hépatocytaire (Brunt 2012).

La première classification histologique proposée, maintenant appelée le système «Brunt» (Brunt, Janney et al. 1999), a été spécialement développé pour la NASH et a suivi le paradigme dans la pratique pour d'autres formes d'hépatite chronique de distinguer des lésions «d'activité» de ceux de changement architectural, c'est à dire le «stade» de fibrose.

Dans ce système, les lésions (stéatose, l'inflammation lobulaire et portale, la ballonisation) caractéristiques de la gravité de la maladie, étaient évaluées de façon semi-quantitative. L'attribution du stade de la maladie a été basée sur l'évolution de la fibrose, sa présence dans les espaces périsinusoïdales dans la zone 3 (stade 1), la fibrose portale/péri-portale (stade 2), fibrose en pont « *bridging* » (stade 3) et la cirrhose (stade 4).

Le score *NAFLD Activity Score* (NAS) a été développé en 2005 par le *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* (NASH-CRN), (Kleiner, Brunt et al. 2005). Ce score d'activité de la maladie est basé sur les principales lésions histologiques de NAFLD. Le score NAS est la somme des scores individuels pour la stéatose (0-3), l'inflammation lobulaire (0-2) et la ballonisation hépatocellulaire (0-2), et varie de 0 à 8.

Le NAS score égale de 1 à 2 confirme l'absence de la NASH, alors que la corrélation avec un diagnostic de la NASH a été définie, si le NAS score est égale de 5 à 8. Le NAS score égale de 3 à 4, considéré comme « borderline », insuffisant pour retenir le diagnostic.

De plus d'autres caractéristiques histologiques sont enregistrées de façon dichotomique (présence ou absence). La fibrose étant évaluée à part, depuis l'absence de fibrose (score 0) jusqu'au stade de cirrhose (score 4).

Récemment, le nouvel score SAF (*Steatosis Activity Fibrosis*) a été proposé pour simplifier la classification des lésions hépatiques chez les patients atteints de NAFLD. Le score SAF évalue les lésions hépatiques suivantes : la stéatose, l'activité inflammatoire (ballonisation et inflammation lobulaire) et la fibrose, séparément de façon semi-quantitative (Bedossa, Poitou et al. 2012). La présence d'une stéatose supérieure à 5% des hépatocytes confirme le diagnostic de NAFLD ($S \geq 1$). Les patients ayant une NAFLD sans ballonisation ou avec une ballonisation minime et sans inflammation lobulaire ($A < 3$) sont classés "stéatose simple". La présence d'une stéatose hépatique ($S \geq 1$) associée à une inflammation sévère ($A \geq 3$) soit à une ballonisation ou une inflammation lobulaire, définit la NASH.

La biopsie hépatique reste le *gold standard* dans l'évaluation de la NASH, mais son interprétation est souvent difficile en raison de l'hétérogénéité des classifications utilisées et d'erreurs d'échantillonnage (Bedossa, Dargere et al. 2003).

La biopsie hépatique sera discutée en détails dans la partie II de cette thèse.

*I-7-2. M*éthodes d'imagerie.

Les différentes méthodes d'imagerie, comme l'échographie, le scanner ou tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont utilisées actuellement pour le diagnostic de NAFLD. Ils permettent identifier la présence d'une stéatose histologique évaluée à plus de 20 ou 30% mais ils ne sont pas capables de détecter la stéatohépatite ou les différents stades de fibrose (Angulo 2002).

Actuellement, l'échographie abdominale reste la méthode la plus utilisée pour le diagnostic de NAFLD (Chalasani, Younossi et al. 2012), qui est accessible et peu coûteuse avec une sensibilité à 60–94% et la spécificité à 66–97% pour la détection de la stéatose (Graif, Yanuka et al. 2000; Palmentieri, de Sio et al. 2006) (Saverymuttu, Joseph et al. 1986).

Le contraste de l'image hépato-rénale est utilisé pour diagnostiquer une stéatose, car en présence d'une stéatose le parenchyme hépatique devient "brillant" comparativement au parenchyme rénal (Osawa and Mori 1996). Ceci a été confirmé par de nombreuses études (Mottin, Moretto et al. 2004; Palmentieri, de Sio et al. 2006; Wu, You et al. 2012).

Par contre, l'échographie a une grande variabilité intra- et inter-observateur, ce qui limite sa reproductibilité et ça rend la non convenable à un suivi longitudinal (Strauss, Gavish et al. 2007). Le seuil de l'échographie pour détecter la stéatose est élevée (20% -30%) par rapport à l'IRM (3% à 5%), elle n'est pas suffisamment sensible pour détecter une stéatose inferieure à 10%, elle détecte seulement 55% et 72% des patients, avec une stéatose 10-19% et 20-29%, respectivement (Ryan, Johnson et al. 2002). Enfin elle ne peut distinguer la stéatose simple de la NASH (Saadeh, Younossi et al. 2002).

Le scanner présente des performances diagnostiques similaires à l'échographie avec un seuil de détection à 20%-30% (Lee, Park et al. 2007), mais s'il est meilleur en termes de détection de la stéatose focale (Park, Kim et al. 2006).

L'IRM (conventionnelle ou couplée à la spectroscopie par protons), semble être une méthode plus performante pour le diagnostic de stéatose hépatique et permet de détecter des seuils inférieurs par rapport à l'échographie et au scanner (Fishbein, Castro et al. 2005). Ni l'inflammation hépatique et ni la surcharge en fer n'influencent pas à l'estimation de la stéatose

par l'IRM (McPherson, Jonsson et al. 2009). L'IRM couplée à la spectroscopie par protons permet de mesurer le taux des triglycérides intra-hépatique et ainsi de quantifier de façon performante la stéatose hépatique (Szczepaniak, Nurenberg et al. 2005).

L'échographie, le scanner et l'IRM (conventionnelle ou couplée à la spectroscopie) peuvent estimer la stéatose hépatique, mais aucun parmi ces méthodes ne peut pas estimer la fibrose hépatique, le principal critère d'évaluation histologique pronostique (Vernon, Baranova et al. 2011) (Musso, Gambino et al. 2011). L'IRM (conventionnelle ou couplée à la spectroscopie) a la meilleure performance pour détecter la stéatose hépatique en comparaison à l'échographie ou au scanner, mais sa disponibilité est très restreinte.

L'élastographie impulsionnelle FibroScan® (EchoSens, Paris, France) est une méthode non-invasive de diagnostic de la fibrose hépatique chez les patients ayant une maladie hépatique chronique. Cette méthode est performante pour le diagnostic d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose et pour prédire les complications associées à la maladie hépatique.

Plus récemment, une nouvelle technique d'imagerie associée à la mesure de l'élastographie FibroScan® a été développée: *le Controlled Attenuated Parameter* (CAP). La mesure du CAP est basée sur l'impact de l'accumulation de graisse hépatique dans la propagation des signaux d'échographie. Le CAP est une nouvelle méthode non-invasive pour estimer la stéatose hépatique. C'est une méthode simple et rapide réalisé simultanément à l'estimation de l'élasticité du foie par le FibroScan. Le principe de la méthode est basé sur l'impact de l'accumulation de graisse hépatique dans la propagation des signaux d'échographie. Le CAP mesure l'atténuation du signal échographique dans le foie à une fréquence de 3.5 MHz en utilisant les signaux acquis par la sonde M (Sasso, Beaugrand et al. 2010).

Cette méthode est disponible uniquement sur les mesures valides et avec la sonde M, le résultat final est la médiane des mesures valides et les critères d'applicabilité de l'examen sont les mêmes que pour l'élastographie (10 mesures valides; IQR/médiane < 30% et TdR > 60%). La mesure du CAP est exprimée en décibels par mètre (dB/m) et varie entre 100 et 400 dB/m (Sasso, Beaugrand et al. 2010).

Dans une étude réalisée par Sasso et al. le CAP a été mesuré chez 115 patients atteints de diverses maladies chroniques du foie avec une PBH comme référence. Le CAP est capable de détecter la stéatose >10%, >33% et >67% avec AUROC de 0.91, 0.95 et 0.89, respectivement. (Sasso, Beaugrand et al. 2010). Le CAP était reproductible selon la seule étude qui a évalué la variabilité inter-observateur (Recio, Cifuentes et al. 2013).

Les limites de la mesure du CAP sont l'applicabilité limitée de la sonde M chez les patients obèses et l'indisponibilité de cette application pour la sonde XL.

L'élastographie impulsionnelle FibroScan® sera discutée en détails dans la partie III de cette thèse.

*I-7-3. M*arqueurs non-invasifs.

Le développement des marqueurs non-invasifs de lésions hépatiques pourrait faciliter le dépistage des patients à risque et assurer le suivi des patients avec la NAFLD/NASH.

Plusieurs marqueurs non-invasifs ont été développés pour diagnostiquer et quantifier la stéatose hépatique, tandis que d'autres ont été conçus pour prédire la NASH ou la fibrose avancée.

I-7-3-1. Marqueurs non-invasifs pour prédire la NASH.

La NAFLD regroupe la stéatose simple (forme bénigne) et la NASH (forme à potentiel évolutif), ce dernier progresse vers la cirrhose dans 20% des cas (McCullough 2004).

Le taux des transaminases ne peut pas être utilisé comme un marqueur diagnostic de la NASH (Mofrad, Contos et al. 2003; Suzuki, Lymp et al. 2006). Avec la réduction de meilleur cut-off d'ALT de 30 UI/L à 19 UI/L, la sensibilité pour le diagnostic de la NASH s'améliore de 42% à 72%, mais la spécificité se diminue de 80 à 42% (Kunde, Lazenby et al. 2005). Les patients ayant une augmentation des transaminases sont plus à risque d'avoir une stéatohépatite, mais celle-ci ne peut être exclue chez les sujets à transaminases normales (Adams and Feldstein 2011).

La NAFLD est associée à une concentration sérique élevée des cytokines pro-inflammatoires, comme le *tumor necrosis factor alpha* (TNFα), l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 8 (IL-8), ainsi que des réactifs de phase aiguë de l'inflammation telles que la protéine C-réactive et la ferritine (Jarrar, Baranova et al. 2008).

L'adiponectine (adipokine anti-inflammatoire) est sécrétée par le tissu adipeux et a une corrélation négative avec l'adiposité, l'insulinosensibilité et le syndrome métabolique (Rabe, Lehrke et al. 2008).

Le taux de TNFα est plus élevé et les taux d'IL-8, visfatine et adiponectine sont plus bas chez les patients ayant la NASH versus la simple stéatose, mais que dans le cas de TNFα et de l'adiponectine la différence était significative ($p < 0{,}003$)(Jarrar, Baranova et al. 2008). Une

analyse de régression multivariée a montré que seul le TNFα était un facteur prédictif indépendant de fibrose histologique et de progression de la maladie chez les patients atteints de NASH ($p < 0,0004$), mais son intérêt en diagnostic clinique est limité.

Des taux plus bas d'adiponectine ont été observés chez des patients avec NASH que chez ceux avec stéatose simple (Lemoine, Ratziu et al. 2009). L'hypoadiponectinémie est associée à l'accumulation de graisse hépatique, l'insulinorésistance et le développement de NASH. (Musso, Gambino et al. 2005; Vuppalanchi, Marri et al. 2005; Baranova, Gowder et al. 2006). Certaines études ont montré une corrélation négative entre le taux d'adiponectine et la sévérité de la NASH. (Hui, Hodge et al. 2004; Targher, Bertolini et al. 2006).

La cytokératine 18 (CK18) est un biomarqueur de l'apoptose des hépatocytes, qui a été le plus étudié et validé dans une large cohorte des patients atteints de NAFLD (>10 études et >1000 patients) (Feldstein, Wieckowska et al. 2009) (Younossi, Jarrar et al. 2008). Le cut-off à 395 U/L donne un excellant résultat pour le diagnostic de la NASH (AUROC 0,93, sensibilité à 85,7 et spécificité à 99,9%) (Wieckowska, Zein et al. 2006). Une méta-analyse a montré AUROC 0,82, sensibilité à 78% et spécificité à 86% (Musso, Gambino et al. 2011).

La combinaison de CK-18 avec d'autres marqueurs sériques de l'apoptose pourrait améliorer la précision diagnostique des tests pour NASH.

Plusieurs marqueurs complexes ont été développés pour prédire NASH (Tableau 1) mais la plupart d'entre eux n'ont pas été validés indépendamment:

Le score HAIR comprenant l'hypertension artérielle, le taux d'ALAT et le score de HOMA, présente une bonne performance avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 89% dans le diagnostic de la NASH chez les patients avec obésité morbide devant subit une chirurgie bariatrique (Dixon, Bhathal et al. 2001).

Le Score Palekar (Palekar, Naus et al. 2006) est la combinaison de l'âge, du sexe, de l'obésité, de l'acide hyaluronique, de l'ASAT et du rapport AST/ALT. La présence de trois facteurs ou plus correspond à une AUROC de 0.76, avec une sensibilité de 73.7% et une spécificité de 65.7%.

Le score Shimada combine les taux d'adiponectine sérique, score HOMA et le taux sérique de collagène 7s type IV. La combinaison des trois marqueurs a une sensibilité de 94% et une spécificité de 74% {Shimada, 2007 #107}.

"The Nice model" combine les variables suivantes: les fragments de la CK18, l'ALT et la présence d'un syndrome métabolique. Ce model a été évalué chez les patients avec obésité

morbide ayant une chirurgie bariatrique. Le meilleur cut-off à 0,14, qui a été associée à une sensibilité à 0,84, une spécificité à 0,86. (Anty, Iannelli et al. 2010)

NASH Diagnostics™ (Younossi, Jarrar et al. 2008) est une formule non divulguée, comprenant l'adiponectine, la résistine et la cytokératine 18 (totale et clivée). Ce score a été développé chez 101 patients obèses morbides et il a montré AUROC satisfaisante à 0,854, mais sa validation chez 79 NAFLD patients a montré une performance inférieure AUROC à 0.70 (Younossi, Page et al. 2011). Les auteurs ont proposé un autre modèle améliorée, nommé "*the NASH diagnostic panel*", qui comprend le diabète de type 2, le sexe, l'IMC, les triglycérides, le taux de CK18 clivé et total (AUROC à 0,81; Se à 91% ; Sp à 92%).

Le NashTest® (Biopredictive, Paris, France) combine 10 marqueurs biochimiques (l'alpha2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoproteine A1, la bilirubine totale, la GGT, la glycémie à jeun, les triglycérides, le cholestérol, l'ALT et l'AST) ajustés sur l'âge, le genre, le poids et la taille du patient. Ce test a été validé dans une large cohorte des patients: 160 patients atteints de la NAFLD, 97 patients dans le groupe de validation multicentrique et 383 patients de contrôle. Le NashTest® a la même performance diagnostique (AUROC 0,79) de la NASH dans deux groupes de NAFLD et de validation. Lorsque les deux groupes ont été regroupés, la spécificité augmente à 94%, mais la sensibilité diminue à 33%(Poynard, Ratziu et al. 2006).

Les tests respiratoires ont aussi été évalués pour prédire la NASH. Le test respiratoire de C-caféine (en anglais *C-caffeine breath test*) est un test quantitatif non-invasif de la fonction hépatique. La caféine a une haute biodisponibilité par voie orale et son métabolisme est presque exclusivement dépendant du cytochrome P4501A2. Ce test montre une bonne performance diagnostique de NASH et de fibrose avancée (AUROC 0,788) (Schmilovitz-Weiss, Niv et al. 2008; Park, Wiseman et al. 2011).

Tableau 1. Les marqueurs complexes pour prédire la NASH.

Auteur	Nom de score	N	Formule	Résultats
Dixon JB et al. (2001)	HAIR	105 patients obèses	Hypertension artérielle, ALT>40 IU/L, Insulinorésistance (index >5)	≥2 paramètrs: AUROC 0.90 Se 80%, Sp 89%
Palekar NA et al. (2006)	Palekar's	80 NAFLD patients	Score est la somme de 6 facteurs de risque: 1. Age ≥50 ans, 2. Genre feminine, 3. AST ≥45 IU/L, 4. IMC ≥30 kg/m2, 5. Rapport AST/ALT ≥0.8, 6. Taux plasmatique de l'acide hyaluronique ≥55 µg/L	≥3 facteurs: AUROC 0.763 Se 74%, Sp 66
Poynard T et al. (2006)	NASH Test	160 patients 97 - groupe de validation 383 - groupe de contrôle	La formule non divulguée: alpha2-macroglobuline, haptoglobine, apolipoproteine A1, bilirubine totale, GGT, glycémie à jeun, triglycérides, cholestérol, ALT et AST, age, sexe, taille et poids.	AUROC 0.79 Se 33%, Sp 94%
Gholam PM et al.(2007)	Gholam's model	97 patients	(-2.627 * AST élevé + 2.13 si le diabètes de type 2)	AUROC 0.90 cut-off 6.6 - Se 83%, Sp 82%
Younossi ZM et al. (2008)	NASH Diagnostics	69 patients obèses morbides 32 groupe de validation	Formule non divulguée: adiponectine, résistine et cytokératine 18 (totale et clivée)	AUROC 0.90 cut-off 0.432 - Se 72%, Sp 91%
Younossi ZM et al. (2011)	NASH Diagnostic Panel	79 patients	Formule non divulguée: diabète de type 2, sexe, IMC, triglycérides, le taux de CK18 clivé et total	AUROC 0.81 2 cut-offs, 0.221 et 0.6183 - Se 91%, Sp 92%
Anty R et al. (2010)	Nice model	464 patients obèses morbides	Formule = -5.654 + 3.780e-02 * ALT (IU/L) + 2.215e-03 * CK 18 fragments (IU/L) + 1.825 * (syndrome métabolique: oui = 1, non = 0) Transformation logarithmique = 1/[1 + Exp(-Nice Model)]	AUROC 0.83-0.88 Cut-off 0.14 - Se 84%, Sp 86%

AUROC, *area under de receiver operator curve*; NASH, la stéatohépatite non-alcoolique ; ALT, Alanine aminotransférase ; Se, sensibilité ; Sp, spécificité ; NAFLD- la stéatose hépatique non-alcoolique ; AST, Aspartate aminotransférase ; IMC, indice de masse corporelle ; GGT, Gamma glutamyl transférase ; CK18, cytokératine 18.

(Adapté de Machado MV., Cortez-Pinto H., J Hepatol. 2013 May; 58(5):1007-19.)

I-7-2-2. **Marqueurs non-invasifs de fibrose.**

La fibrose hépatique est le critère principal de jugement de gravité de la maladie, de suivi des patients sans et en cours du traitement. Plusieurs scores ont été développés pour évaluer la fibrose chez les patients ayant la NAFLD/NASH (Tableau 2).

Le score BARD, combinant le rapport AST/ALT, l'IMC et la présence de diabète de type 2, a été développé et validé dans 827 patients ayant la NAFLD avec la fibrose histologiquement prouvée (Harrison, Oliver et al. 2008). Un score BARD >2 prédit une fibrose avancée avec une valeur prédictive négative de 96%. La majorité des patients NAFLD sont dessus de ce seuil en raison de l'obésité et le diabète, ce qui entraîne une mauvaise valeur prédictive positive et limite l'utilité dans la pratique.

The NAFLD fibrosis score (NFS) est un score non-invasif basé sur six critères biologiques: l'âge, l'hyperglycémie, l'IMC, le taux des plaquettes, le taux d'albumine et le rapport ASAT/ ALAT (Angulo, Hui et al. 2007; Dowman, Tomlinson et al. 2011), qui permet d'évaluer la quantité de fibrose dans le foie. NFS = -1.675 + 0.037 × age (years) + 0.094 × BMI (kg/m2) + 1.13 × IFG/diabetes (yes = 1, no = 0) + 0.99 × AST/ALT ratio – 0.013 × platelet (×109/l) – 0.66 × albumin (g/dl)(Angulo, Hui et al. 2007).

La probabilité de fibrose (F0-F2) est très faible si le score <-1,5, moyenne >-1,5 à <0,67 et la probabilité avoir la fibrose avancée (F3-F4) est importante > 0,67 (Treeprasertsuk, Bjornsson et al. 2013). Le NFS a été validé versus une biopsie hépatique et il est très performant pour identifier les patients ayant la NAFLD avec la fibrose avancée (Angulo, Hui et al. 2007).

Une autre étude a été effectuée chez les patients souffrants d'une obésité morbide et la NAFLD qui vont subir une chirurgie bariatrique, qui confirme que le NFS est performant pour exclure la fibrose avancée dans cette population (Qureshi, Clements et al. 2008).

Pour la première fois, les guidelines AASLD de 2012 suggèrent d'utiliser un test sanguin, le NAFLD Fibrosis Score (NFS), pour le diagnostic non-invasif de la fibrose hépatique chez les patients ayant une NAFLD (Chalasani, Younossi et al. 2012).

Un autre score qui permet de diagnostiquer et quantifier la fibrose dans la pratique clinique est le FibroMètre®. C'est un score basé sur les paramètres suivants : âge, poids, glycémie à jeun, AST, ALT, ferritine et le taux des plaquettes. Le résultat varie entre 0 et 1 qui correspond à la probabilité d'une fibrose significative ou d'une cirrhose (Festi, Schiumerini et al. 2013).

Le Fibromètre® a été évalué chez 235 patients avec une stéatose échographique et au moins un des critères du syndrome métabolique (Cales, Laine et al. 2009). L'AUROC pour les diagnostics de fibrose significative et de cirrhose étaient de 0,943 et 0,929 respectivement. Une biopsie pouvait être évitée chez plus de 95 % des patients. Les auteurs ont constaté que la FibroMètre® a une performance diagnostique de fibrose hépatique meilleure (AUROC 0.943) par rapport à NFS (AUROC 0.884)(Cales, Laine et al. 2009).

Le FibroTest® un biomarqueur breveté qui appartient à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP, Paris, France) et qui est commercialisé par BioPredicitive® (Paris, France). Le FibroTest comprend les marqueurs biochimiques de fibrose hépatique : l'apha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotèine-A1, la bilirubine totale et le gamma glutamyl transférase (GGT) ajusté sur l'âge et le sexe. Initialement le FibroTest a été validé chez les patients avec une hépatite C, mais également il a été validé chez les patients ayant la NAFLD.

Le FibroTest a été évalué chez 170 patients suspects de NAFLD vus dans un centre de référence, mais aussi chez 97 patients (prenant part à une étude multicentrique) et dans le groupe de contrôle - 954 donneurs de sang. FibroTest a la même performance diagnostique de fibrose avancée (F2-F4) dans deux groupes de validation AUROC 0.75-0.86, et de fibrose sévère/cirrhose (F3F4): 0.81-0.92.

Lorsque les deux groupes ont été regroupés avec un cut-off de FibroTest à 0,30 a NPV à 90% pour une fibrose avancée (Se 77%); un cut-off de FibroTest à 0,70 a PPV à 73% pour une fibrose avancée (Sp 98%) (Ratziu, Massard et al. 2006).

Le score BAAT est basé sur 4 facteurs de risque de fibrose : BMI > 28, âge > 50, ALT > 2 N, triglycérides > 1,7 mmol/l. Ce score a été testé chez 93 patients obeses avec bilan hépatique perturbé. Un score de 0 à 1 (30% des malades de l'étude) a une valeur prédictive négative de 100% pour la fibrose septale et la cirrhose (Ratziu, Giral et al. 2000).

Le score FIB-4 (l'âge, le taux de transaminases et des plaquettes) a été développé pour évaluer la fibrose avancée chez les patients ayant une hépatite C chronique (Vallet-Pichard, Mallet et al. 2007). Sa performance a été comparée à celles d'autres scores de fibrose chez les patients atteints de la NAFLD, montrant une meilleure AUROC 0,86 en comparaison avec le NFS et le FT (McPherson, Stewart et al. 2010; Adams, George et al. 2011).

The European Liver Fibrosis Study a développé par *European Liver Fibrosis score* (ELF) et validé chez 1021 patients, dont 61 patients atteins de la NAFLD. Le score ELF combine l'âge, l'acide hyaluronique, le propeptide amino-terminal de collagène de type III et l'inhibiteur

tissulaire de la métalloprotéinase 1 (TIMP-1). Le score ELF présente une bonne performance diagnostique de la fibrose avancée (AUROC 0,87)(Rosenberg, Voelker et al. 2004).

Un score ELF a été simplifié (âge exclu) et a été testé chez 196 patients atteints de la NAFLD. Un score égal à 0.36 a montré une meilleure AUROC, à 0.93, et une meilleure sensibilité à 80% pour le diagnostic la fibrose avancée (F3-F4) et la spécificité à 90% pour l'exclure. Le modèle d'application clinique a montré que 82% et 88% des biopsies hépatiques pour le diagnostic de la fibrose sévère pourront être potentiellement évitées en utilisant le score ELF et le score combiné (Guha, Parkes et al. 2008).

Le score ELF a été évalué chez 112 enfants ayant la NAFLD. Les valeurs de score ELF de 9.28 à 10.51 avaient une sensibilité de 88 à 100% et spécificité de 76 à 98% pour séparer les différents stades de fibrose (AUROC 0.90-0.99)(Nobili, Parkes et al. 2009).

The NAFLD Diagnostic Panel est un score pour le diagnostic la fibrose avancée qui comprend le diabète de type 2, les triglycérides, l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 et AST. La performance satisfaisante (AUROC 0.81) a été démontrée chez 79 patients atteints de la NAFLD. Ces résultats doivent être validé par d'autres études chez plus grand nombre de patients (Younossi, Page et al. 2011).

Plusieurs marqueurs non-invasifs ont été proposés pour évaluer la stéatose hépatique: Stéatotest®(Poynard, Ratziu et al. 2005), Fatty Liver Index (Bedogni, Bellentani et al. 2006), NAFLD score (Kotronen, Peltonen et al. 2009), ont été validés de manière indépendante (Gastaldelli, Kozakova et al. 2009) (Zelber-Sagi, Nitzan-Kaluski et al. 2008).

Le sujet sur les biomarqueurs non-invasifs pour quantifier la stéatose chez les patients ayant la NAFLD sera discuté en détails dans la partie IV de cette thèse.

Tableau 2. Les marqueurs complexes pour prédire la fibrose.

Auteur	Nom de score	Nombre de patients	Formule	AUROC (fibrose avancée)	Résultats
Ratziu et al.(2000)	BAAT	93 NAFLD patients	Somme de 4 facteurs de risque de fibrose: 1. Age ≥50 ans, 2. IMC ≥28 kg/m2, 3. Triglycerides ≥1.7 mmol/L, 4. ALT ≥2 N	0.86	Se 14%, Sp 100%, VPP 100%, VPN 73%
Rosenberg et al. (2004)	Original European Liver Fibrosis score (OELF)	1021 patients, 61 NAFLD patients	OELF = -6.38 - (Ln(âge) * 0.14) - [Ln(acide hyaluronique) * 0.616] - [Ln(propeptide amino-terminal de collagène de type III) * 0.586] - [Ln(inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1) * 0.472]	0.87	cut-off 0.375 Se 89%, Sp 96%, VPP 80%, VPN 90%
Guha et al. (2008)	ELF simplifié	196 NAFLD patients	ELF = -7.412 - [Ln(acide hyaluronique) * 0.681] - [Ln(propeptide amino-terminal de collagène de type III) * 0.755] - [Ln(inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1) * 0.494]	0.87	cut-off -2.3824 Se 91%, Sp 59%, VPP 42%, VPN 95%
Ratziu et al. (2006)	FibroTest®	170 (contrôle) 97 (validation)	La formule non divulguée: l'apha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotèine-A1, la bilirubine totale et le gamma glutamyl transférase (GGT) ajusté sur l'âge et le sexe	0.75-0.86	2 cut-off: 0.3 et 0.7 Se 77%, Sp 98%, VPP 90%, VPN 73%
Angulo et al. (2007)	NAFLD Fibrosis Score	480 (contrôle) 253 (validation)	NFS = -1.675 + 0.037 × âge (années) + 0.094 × IMC (kg/m2) + 1.13 × l'hyperglycémie à jeun/diabète (oui=1, non=0) + 0.99 × AST/ALT – 0.013 × plaquettes (×10 9/l) – 0.66 × albumine (g/dl)	0.84	2 cut-off: -1.455 et 0.676 Se 82%, Sp 98%, VPP 90%, VPN 93%
Harrison et al. (2008)	BARD	827 NAFLD patients	Combine 3 variables: 1. IMC ≥28 kg/m2, 2. rapport AST/ALT ≥0.8, 3. Diabète de type 2	0.81	Score >2 fibrose avancée VPP 43%,VPN 96%
Calès et al. (2009)	FibroMètre®	235 NAFLD patients	score basé sur les paramètres suivants : âge, poids, glycémie à jeun, AST, ALT, ferritine et le taux des plaquettes	0.943	2 cut-off: 0.611 et 0.715 Se 79%, Sp 96%, VPP 88%, VPN 92%
McPherson et al. (2010)	FIB-4	145 NAFLD patients	Age (années) * AST (IU/L)/Taux de plaquettes (10 9/L) * ALT 1/2 (IU/L)	0.86	cut-off: 1.3 Se 85%, Sp 65%, VPN 95%
Younossi et al. (2011)	NAFLD Diagnostic Panel	79 NAFLD patients	La formule non divulguée: diabète de type 2, les triglycérides, l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 et AST.	0.81	2 cut-off: 0.0816 et 0.364 Se 93%, Sp 91%, VPP 58%, VPN 95%

AUROC, area under de receiver operator curve; NASH, la stéatohépatite non-alcoolique ; ALT, Alanine aminotransférase; Se, sensibilité ; Sp, spécificité ; NAFLD- la stéatose hépatique non-alcoolique ; AST, Aspartate aminotransférase ; IMC, indice de masse corporelle ; VPN, valeur prédictive négative; VPP, valeur prédictive positive;

Chapitre II. Evaluation histologique de la NAFLD.

La PBH est le moyen de référence pour diagnostiquer une stéatohépatite, la différencier d'une stéatose et déterminer le stade de la fibrose. Elle permet aussi d'éliminer les autres causes d'hépatopathie chronique associées et préjuger du pronostic ou de l'efficacité thérapeutique. La PBH est un examen invasif, douloureux et coûteux, non exempt de complications (Cadranel, Rufat et al. 2000), avec mortalité évaluée à 1/10 000 (Bravo, Sheth et al. 2001) et qui doit se réaliser en milieu hospitalier

II-1. Indications de PBH actuelles chez patients atteints de la NAFLD.

Selon les recommandations d'Association européenne pour l'étude du foie publiés en 2009 *(European Association for the Study of Liver Diseases, EASL)* la réalisation d'une biopsie hépatique est recommandée quand les marqueurs non invasifs suggèrent la présence d'une fibrose avancée et quand leurs résultats sont discordants ou jugés insuffisants pour exclure la fibrose avancée.

La PBH pourrait être aussi réalisé dans un premier temps chez les patients à risque élevé d'avoir une hépatopathie avancée, à ceux qui ont l'élévation d'ALAT et la stéatose à l'échographie.

Les recommandations suggèrent qu'une PBH pourrait être effectuée en même temps que les interventions chirurgicales, comme la chirurgie anti-obésité (risque élevé de NASH et de la cirrhose) et la cholécystectomie (facteurs de risque communs de la NAFLD et la lithiase biliaire)(Ratziu, Bellentani et al. 2010).

D'après les recommandations d'Association américaine pour l'étude du foie de 2012 *(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)* une PBH devrait être réalisée chez les patients atteints de la NAFLD avec le syndrome métabolique, qui sont à risque élevé d'avoir la NASH et la fibrose (Chalasani, Younossi et al. 2012).

II-2. Technique de la PBH.

La technique la plus utilisée pour réaliser une PBH est la technique transpariétale décrite par Menghini il y a plus que 55 ans (Menghini 1957). Une échographie récente (<6 mois) permet d'apprécier la taille et la position du foie et de la vésicule biliaire et de rechercher une lésion focale.

Le malade est placé en décubitus dorsal ou en décubitus latéral gauche modéré, le bras droit en abduction maximale. Les limites du foie sont déterminées par la percussion et la palpation et repérées par échographie. Le point de ponction est idéalement déterminé par l'échographie, sinon il se situe en pleine matité hépatique sur la ligne médio-axillaire.

Après désinfection de la peau (la polyvidone iodée en l'absence d'allergie), cet espace est infiltré plan par plan à l'aide d'un anesthésique local (lidocaïne à 1%, en l'absence d'allergie et de porphyrie) jusqu'à la capsule de Glisson, l'aiguille passant au bord supérieur de la côte inférieure. Une petite incision cutanée est effectuée. L'aiguille à biopsie est introduite dans l'espace intercostal, puis le patient bloque sa respiration au cours du temps expiratoire.

La technique varie selon le type d'aiguille. L'aiguille de Menghini modifiée est adaptée à une seringue partiellement remplie de sérum physiologique; la dépression est effectuée lorsque l'aiguille est dans l'espace intercostal, puis l'aiguille est rapidement enfoncée dans le foie sur une profondeur de 3 à 3,5 cm. L'aiguille coupante comporte un couperet qui, en coulissant, découpe une carotte hépatique (Cadranel 2002). Un seul passage est suffisant pour obtenir un fragment de biopsie de qualité satisfaisante, (taille ≥1 cm ou d'au moins 6 à 8 espaces porte dans la plupart des hépatopathies chroniques). Le nombre de complications apparaît à partir de 2 passages et le nombre de complications sévères au-delà de 3 passages (Cadranel, Rufat et al. 2000).

*II-3.C*omplications de la PBH.

Les complications les plus fréquentes sont la douleur chez 20 à 30% des malades (Gilmore, Burroughs et al. 1995) (Cadranel, Rufat et al. 2000) et le malaise vagal dans 0,4% à 2% des cas, avec collapsus 0,2% (Piccinino, Sagnelli et al. 1986) (Cadranel, Rufat et al. 2000).

La douleur est la complication la plus fréquente de la PBH. Une douleur intense survient chez 3 à 5% des patients (Perrault, McGill et al. 1978) et doit faire rechercher une complication. Certaines études ont démontré que l'apparition de la douleur est lié à l'expérience de l'opérateur (Cadranel, Rufat et al. 2000) (Froehlich, Lamy et al. 1993). L'utilisation d'analgésiques est nécessaire dans 30% des cas lorsque la ponction est guidée par échographie (Cadranel, Rufat et al. 2000).

Les complications majeures sont plus rares: l'hémorragie, la péritonite biliaire, la perforation et le pneumothorax. Le risque de décès est faible, lié aux complications hémorragiques. La fréquence des complications sévères augmente avec le nombre de passages (4,3% au delà de 2 passages contre 0,5% avec un seul passage) (Cadranel, Rufat et al. 2000).

Une hémorragie, bien que rare (Buckley and Petrunia 2000), est le principal risque de la PBH transpariétale. Un saignement significatif (baisse du taux d'Hg à > 2 g/dl) survient dans 0,35 à 0,5 % des cas (McGill, Rakela et al. 1990). L'hémorragie intra-péritonéale est la complication la plus grave, le risque est estimé entre 0,16 et 0,32% (McGill, Rakela et al. 1990) (Piccinino, Sagnelli et al. 1986) (Garcia-Tsao and Boyer 1993).

II-4. PBH transjugulaire.

La biopsie transjugulaire (réalisée par voie transveineuse) est une méthode qui permet de prélever un échantillon de foie sans traverser la capsule. Elle se fait sous anesthésie locale chez des malades à jeun et couchés sur le dos. Un cathéter est introduit dans la veine jugulaire interne, le plus souvent droite, et est ensuite guidé sous contrôle télévisé dans une veine hépatique droite. Puis une aiguille à biopsie de 45 cm de long est glissée jusqu'à l'extrémité distale du cathéter. L'aiguille est ensuite poussée dans le parenchyme hépatique et on aspire à l'aide d'une seringue préalablement remplie de sérum physiologique le fragment hépatique qui est recueilli dans la seringue reliée à l'aiguille.

Elle peut être utilisée en cas de contre-indication à une PBH transpariétale: troubles de l'hémostase, ascite abondante, foie cardiaque ou vasculaire, traitement anticoagulant ou antiagrégant ne pouvant être arrêté, hémodialyse, insuffisance rénale chronique, suspicion d'amylose, nécessité de vérifier l'existence d'une hypertension portale ou son degré (Lebrec, Goldfarb et al. 1982). Les contre-indications de la PBH transjugulaire sont : le kyste hydatique, l'angiocholite, les déficits constitutionnels de l'hémostase non corrigée, la dilatation des voies biliaires.

II-5. Diagnostic histologique de la NAFLD/NASH.

La NAFLD est caractérisée par la présence d'une stéatose macrovésiculaire dans > 5% des hépatocytes. La définition histologique de la NASH est basée sur une combinaison de trois lésions (stéatose, inflammation, ballonisation) dans une distribution topographique caractéristique (principalement centrolobulaire, zone 3) (Kleiner, Brunt et al. 2005).

La stéatose (accumulation des triglycérides) est une condition préalable pour le diagnostic de la NASH, à l'exception du stade de cirrhose où il peut être absent. Le seuil minimal est 5% des hépatocytes contenant des gouttelettes de graisse. Les lésions hépatocellulaires apparaissent sous forme de ballonisation mais peuvent aussi apparaître sous forme de corps

apoptotiques (acidophiles) et de nécrose cellulaire. L'infiltrat à polynucléaires neutrophiles et les corps de Mallory sont fréquents mais ne sont pas des lésions obligatoires pour le diagnostic de NASH (Brunt 2009).

La stéatose macrovésiculaire est le plus souvent présente sous la forme d'une seule grosse gouttelette qui déplace le cytoplasme vers la membrane et le noyau de manière excentrée. La stéatose microvésiculaire est observée jusqu'à 10% des biopsies avec NASH (Tandra, Yeh et al.).

La NASH doit être différenciée de la stéatose isolée ou associée à une inflammation non spécifique, en raison d'un pronostic différent (Matteoni, Younossi et al. 1999).

La fibrose périsinusoïdale est une des caractéristiques histologiques de la stéatohépatite métabolique mais une fibrose portale peut être aussi observée (Kleiner, Brunt et al. 2005). Jusqu'à 20% de patients atteints de la NAFLD ont les anticorps antinucléaires, anticorps anti-muscle lisse et/ou les anticorps anti-mitochondries (Cotler, Kanji et al. 2004) (Loria, Lonardo et al. 2003) (Adams, Lindor et al. 2004). L'examen histologique est important pour écarter le diagnostic de maladie hépatique auto-immune et c'est le seul moyen de déterminer la cause sous-jacente de la maladie.

*II-6. C*lassifications histologiques.

Les trois classifications pathologiques importantes ont été proposées pour la NAFLD: la classification de Matteoni (Matteoni, Younossi et al. 1999), la classification de Brunt (Brunt, Janney et al. 1999) et le score d'activité NALFD (NAS) (Kleiner, Brunt et al. 2005).

La première classification histologique a but pronostic a été proposée par Matteoni et al. en 1999 (Matteoni, Younossi et al. 1999). Les auteurs ont étudié les biopsies de 132 patients ayant la NAFLD et les ont séparées en quatre catégories: stéatose isolée (type 1) ; stéatose et inflammation lobulaire (type 2); stéatose et ballonisation hépatocellulaire (type 3) ; stéatose avec ballonisation plus les corps de Mallory ou fibrose (type 4).

Les auteurs ont confirmé l'évolution clinique bénigne des types 1 ou 2 ("non-NASH") et l'évolution progressive des types 3 ou 4, que correspond au tableau clinique et histologique de la NASH.

La première classification histologique qui a permis d'évaluer l'activité nécrotico-inflammatoire et la fibrose chez les patients atteints de la NASH, a été crée en 1999 par Brunt et al (Brunt, Janney et al. 1999). Dans cette classification, les lésions de la gravité de la NASH (stéatose, inflammation lobulaire et portale et la ballonisation hépatocellulaire) étaient évaluées

de façon semi-quantitative.

Le score Brunt représente la somme de valeurs attribuées: stéatose (0-3), inflammation lobulaire (0-3) et la ballonisation (0-2); allant donc de 0 à 8. La fibrose, qui est considéré comme un résultat de l'activité de la maladie, n'est pas incluse en tant que composante du score d'activité. La non-inclusion de la fibrose aux autres caractéristiques de l'activité est un paradigme accepté dans la NASH (Brunt, Janney et al. 1999) et les hépatites virales (Brunt 2000).

Les auteures ont décrit trois grades d'activité de la NASH : Grade 1 (minime) est caractérisé par la présence de stéatose <66 % sur la PBH, la ballonnisation minime et l'absence ou présence d'inflammation lobulaire ou portale minime. Le Grade 2 (modéré) est caractérisé par la stéatose ≥ 66 %, la ballonnisation modérée et l'inflammation lobulaire modérée, l'inflammation portale minime à modérée. Le Grade 3 (sévère) est caractérisé par la stéatose diffuse > 66 %, la ballonnisation marquée et l'inflammation lobulaire et portale importante.

Le stade de maladie est défini par l'importance et la topographie de la fibrose: le stade & dénote une fibrose périsinusoidale; le stade sa présence dans les espaces périsinusoïdales de la zone 3 (stade 1), la fibrose portale.....etc. ou périportale (stade 2), fibrose en pont (stade 3) et la cirrhose (stade 4) (Brunt, Janney et al. 1999).

Actuellement la classification histologique la plus souvent utilisée est le NAS score (*NAFLD activity score*), qui a été développé et publié en 2005 par Kleiner et al. du *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* (Kleiner, Brunt et al. 2005). Les principaux paramètres histologiques inclus dans ce score sont: la stéatose, l'activité inflammatoire lobulaire, la ballonisation hépatocytaire et la fibrose.

Le score NAS grade ces trois composantes et détermine une valeur entre 0 et 8. Le NAS permet d'évaluer l'importance de l'activité de la NAFLD et, possiblement, le suivi évolutif. (Tableau 3). Le NAS score a été créé pour évaluer la gravité de la maladie et il ne peut pas être utilisé comme une méthode de substitution pour établir le diagnostic de NASH (Brunt, Kleiner et al.).

Tableau 3. NAS score.

Degré d'activité de la NASH	NAFLD Activity Score (NAS)			
	0	1	2	3
Stéatose	< 5%	5%-33%	>33%-66%	> 66%
Inflammation lobulaire (x200/champ)	sans infiltrat	< 2 infiltrats	2-4 infiltrats	> 4 infiltrats
Ballonisation	Absence	Quelques	Nombreuses	

Stade de la fibrose de la NASH	**Stade**
Aucune	0
Légère, fibrose périsinusoïdale zone 3	1a
Modérée, fibrose périsinusoïdale zone 3	1b
Fibrose portale/périportale uniquement	1c
Fibrose périsinusoïdale et portale/périportale Zone 3	2
Ponts fibreux (porto-portaux)	3
Cirrhose	4

Adapté de Kleiner et al., Hepatology 2005;41:1313–21

Récemment, Bedossa et al (Bedossa, Poitou et al. 2012) ont développé un nouveau score, le SAF (*Steatosis Activity Fibrosis*) qui permet la classification des lésions histologiques de NAFLD, à partir de biopsies réalisées chez des patients obèses morbides au cours d'une intervention chirurgicale bariatrique.

Quarante biopsies de plus de 20 mm ont été lues une première fois par 6 experts indépendants et les lésions classées en stéatose ou en NASH selon les scores habituels. Les mêmes lames ont été relues et les lésions interprétées selon le SAF score. La concordance des résultats, qui était moyenne au cours de la première lecture (K = 0,54) était améliorée en utilisant le score SAF (K = 0,66) avec des coefficients de concordance de 0,61 pour la stéatose (0-3), 0,75 pour l'activité (0-4) et 0,84 pour la fibrose (0-4) en regroupant les scores de fibrose de Kleiner (1a, 1b, 1c) en un seul stade 1.

Le score SAF évalue les lésions hépatiques suivantes : la stéatose, l'activité inflammatoire (la ballonisation et l'inflammation lobulaire) et la fibrose, séparément de façon semi-quantitative (Bedossa, Poitou et al. 2012). La présence d'une stéatose supérieure à 5% des hépatocytes confirme le diagnostic de NAFLD (S≥1). Les patients ayant une NAFLD sans ballonisation ou avec une ballonisation minime et sans inflammation lobulaire (A<3) sont classés

"stéatose simple". La présence d'une stéatose hépatique (S≥1) associée à une inflammation sévère (A≥3) soit à une ballonisation ou une inflammation lobulaire, définit la NASH.

En contraste avec le NAS score, le score SAF mesure la stéatose séparément de marqueurs de lésions cellulaires (la ballonnisation et l'inflammation lobulaire) et ce pourquoi peut mieux discriminer la NASH.

Le caractère invasif de la biopsie hépatique est une limitation majeure, rendant impossible d'utiliser en population générale comme une méthode pronostique. Par conséquent, une approche pragmatique de diagnostic de la maladie en utilisant des stratégies non invasives est nécessaire, en se réservant la biopsie hépatique pour les patients où elle peut avoir des informations supplémentaires cliniquement pertinente (Anstee, McPherson et al. 2011).

II-7. Limitations de biopsie hépatique.

Bien que la biopsie hépatique reste actuellement le gold standard pour le diagnostic de NASH, elle a de certaines limites comme la variabilité intra-observateur (Younossi, Gramlich et al. 1998; Kleiner, Brunt et al. 2005), les erreurs d'échantillonnage (Ratziu, Charlotte et al. 2005) (Janiec, Jacobson et al. 2005) et la distribution hétérogène de la fibrose dans le foie (Goldstein, Hastah et al. 2005).

II-7-1. Erreurs d'échantillonnage.

Le fragment de la ponction-biopsie d'une taille moyenne de 15 mm représente seulement 1/50000e du foie et que les lésions histologiques, si elles sont diffuses, ne sont pas homogènes.

Le fragment obtenu par voie transjugulaire est interprétable dans 64 à 100 % des cas, avec une moyenne de 0,63 cm par voie transjugulaire au lieu de 1,5 cm par voie transpariétale (Bass and Yao 2001). La présence d'une cirrhose est un facteur de risque de fragmentation de la biopsie.

La PBH reste un examen de référence pour le diagnostic de NASH. Par contre, les erreurs d'échantillonnage peuvent limiter le diagnostic. Les deux biopsies hépatiques prélevées chez le même patient au même moment peuvent parfois être discordantes. Une étude de doubles biopsies a été réalisée chez les patients ayant subi un by-pass gastrique, a démontré un taux de discordance pour le diagnostic de fibrose portale de 26%, la fibrose dans la zone 3 (13%) et la ballonisation (3%) (Arun, Jhala et al. 2007).

Une autre étude réalisée chez des patients ayant eu deux ponction-biopsies hépatiques transparietales synchrones (Ratziu, Charlotte et al. 2005), a confirmé la variabilité de distribution de la ballonisation, de l'inflammation lobulaire et d ela fibrose.

Le taux de discordance dans la présence de ballonisation hépatocytaire de 18% et l'absence de ballonisation chez 24% des patients avec une seule biopsie effectué. Chez 35% des patients atteints de fibrose en pont le diagnostic sera sous-estimé, s'ils ont eu qu'une seule biopsie. Une autre étude réalisée par Merriman et al. (Merriman, Ferrell et al. 2006), chez les patients obèses morbides qui subissent la chirurgie bariatrique par laparoscopie, a démontré la variabilité significative entre les biopsies du lobe droit et du lobe gauche et la précision diagnostique était significativement plus élevé en associant le résultat de biopsie du lobe droit et de lobe gauche plutôt que quand ces résultats étaient pris isolément.

Les auteurs ont montré que le taux de concordance des biopsies dans le diagnostic des lésions nécro-inflammatoires est très bas, même pour les biopsies évaluées par le même anatomopathologiste (Merriman, Ferrell et al. 2006).

Par contre, Larson et al. (Larson, Bowers et al. 2007) ont comparé les échantillons de biopsies hépatiques peropératoires réalisées dans le lobe hépatique droit et le lobe gauche chez 43 patients obèses (IMC à 46,2 kg/m^2) pour le diagnostic de NAFLD. La taille des biopsies était en moyenne de 22 mm dans le lobe droit et 23 mm dans le lobe gauche. Les auteurs montrent une variabilité minimale de la gravité de la stéatose (kappa = 0,91), NAS score $\geq$ 5 (kappa = 0,83), et la fibrose (kappa = 0,96). Ils ont observé une variabilité plus marquée pour l'inflammation (kappa = 0,58) et la ballonisation (kappa = 0,73).

Une étude rétrospective réalisée par Ratziu et al. a montré que au cours du suivi, avec ou sans traitement, seuls les changements de la stéatose étaient significativement plus élevés que ce qui était attendu du simple fait de la variabilité d'échantillonnage (47 vs 8%, p <0,0001); ce n'était pas le cas pour le grade d'activité ni pour la ballonisation. Il y avait seulement un effet marginal sur la fibrose sans démonstration convaincante d'un changement de la fibrose (Ratziu, Bugianesi et al. 2007).

Une étude réalisée par Janiec and al.(Janiec, Jacobson et al. 2005), a démontré le taux des erreurs d'échantillonnage des biopsies hépatiques du lobe droit et gauche faites chez 10 patients obèses morbides subissant un by-pass gastrique. Les biopsies ont été évaluées de façon aléatoire puis réévalués en aveugle par un anatomopathologiste. Ils ont observé chez 3 patients (30%) la différence au moins d'un 1 stade entre les lobes droit et gauche. Un patient avait la

différence de 2 stades entre deux échantillons appariés, avec la différence significative de tailles de biopsie et le nombre des espaces portes. Les échantillons d'une biopsie hépatique fais dans le lobe droit et gauche ont montré des même grades de l'activité de la maladie, mais les stades histopathologiques différents dans 30 % des patients atteints de NAFLD. La biopsie de taille adéquate (>1,0 cm de longueur avec > 10 espaces portales) réduit considérablement l'erreur d'échantillonnage.

Une étude faite par Goldstein and al. (Goldstein, Hastah et al. 2005) a démontré le problème de hétérogénéité de la fibrose chez NASH patients. Ils ont examiné les biopsies de 46 patients ayant la NASH et 52 patients avec l'hépatite C pour déterminer l'importance de l'hétérogénéité de la fibrose et établir la taille minimale de la biopsie hépatique pour l'évaluation adéquate de la fibrose. La petite taille de la biopsie était associé de façon significative avec une plus grande hétérogénéité de la fibrose dans la NASH (coefficient, -1,3, p <0,001), mais pas dans le VHC (P = 0,901). Les biopsies de plus de 1,6 cm avaient la valeur de l'hétérogénéité de la fibrose dans la NASH significativement plus faible que les échantillons égales à 1,6 cm ou plus courts (1,2 vs 3,4, p = 0,012). Les auteurs précisent que la taille minimale de la biopsie devrait être de plus de 1,6 cm chez les patients atteints de NASH pour un diagnostic fiable de la fibrose.

II-7-2. Variabilité inter- et intra-observateur.

La variabilité (inter- et intra-observateur) présente également un problème très important pour le diagnostic de NAFLD.

Une étude réalisée par Younossi et al.(Younossi, Gramlich et al. 1998) a évalué la variabilité inter- et intra-observateur des lésions histologiques associées à la NAFLD. Les lésions histologiques ont été évaluées pour chaque échantillon de biopsie hépatique par quatre anatomopathologistes et deux fois en aveugle par deux parmi quatre pathologistes. Dix-neuf paramètres histologiques (stéatose, inflammation, lésion cellulaire, fibrose etc.) ont été évalués sur 53 échantillons de biopsie hépatique. Une concordance significative était présente en évaluation de degré de stéatose (κ = 0,64), de degré et de la localisation de fibrose (κ = 0,60) et la ballonisation (κ = 0,50), mais que l'évaluation de l'activité inflammatoire était incompatible à un taux élevé (κ = 0,33).

Une autre étude réalisée par Gawrieh et al. (Gawrieh, Knoedler et al.) a évalué la reproductibilité de l'interprétation des lésions histologiques de la NAFLD, en utilisant des images histologiques de la NAFLD et des feuilles de scores avec des critères diagnostiques écrits pour les différents phénotypes de NAFLD. Deux pathologistes ont réalisé la première lecture et

la relecture de 65 biopsies hépatiques faites pour l'évaluation de suspicion de NAFLD. La concordance l'intra- et inter-observateur était la plus élevée en évaluation de la stéatose et la fibrose. L'utilisation des images histologiques et des feuilles de scores considérablement amélioré la concordance intra-observateur sur l'évaluation de ballonisation (κ 0.56, [P = .009]). Cette étude démontre ainsi la variabilité inter-observateur dans la vraie vie.

Dans l'étude réalisée par Fukusato et al. (Fukusato, Fukushima et al. 2005), huit anatomopathologistes expérimentés ont évalué indépendamment les biopsies hépatiques de 21 patients (NASH ou NASH suspecté). La concordance inter-observateur a été suffisante pour la stéatose et la fibrose mais elle était faible pour la ballonisation, l'inflammation lobulaire et l'infiltration par des polynucléaires neutrophiles. La concordance a été seulement modérée pour le diagnostic de NASH.

Vuppalanchi et al (Vuppalanchi, Unalp et al. 2009) ont examiné la relation entre les résultats histologiques et le nombre de passages d'une biopsie transpariétale chez 50 patients atteints de la NAFLD. Le diagnostic de NASH était fait plus rarement quand un seul passage était examiné que quand deux l'étaient (37% vs 57%, p <0,001), alors qu'un troisième passage n'augmentait pas la précision diagnostique (57% vs 61%, p = 0,3). La stéatose, l'inflammation lobulaire et la fibrose étaient significativement plus élevées lorsque 3 passages ont été analysés, comparativement à 2 passages. Cependant, entre les groupes, il n'y avait pas de différence significative en évaluation de la ballonisation, score d'activité NAS ≥ 4 ou proportion de NASH (57% vs 61%, P = 0.3). La taille d'un fragment de biopsie a une corrélation avec le diagnostic de NASH (29%, 46%, 56%, 65% et si le fragment de biopsie mesure <10 mm, 10-14 mm, 15-24 mm, ≥ 25 mm, respectivement, p <0,0001). Les auteurs ont conclu que l'analyse d'un seul fragment hépatique (un passage de biopsie transpariétale) peut être insuffisante pour établir le diagnostic de NASH.

En conclusion, la ponction biopsie hépatique est la seule méthode pour établir le diagnostic de la NASH, basée sur l'association de trois caractéristiques : la stéatose >5%, l'inflammation lobulaire et la ballonisation. La PBH permet également d'éliminer des autres causes d'hépatopathie chronique associées. Cependant, la biopsie est un examen invasif, coûteux, nécessite d'une hospitalisation, non exempt de complications et de certaines limitations comme la variabilité intra-observateur et les erreurs d'échantillonnage.

Chapitre III. Elastographie impulsionnelle (Le FibroScan®)

Le FibroScan est une méthode de diagnostic et de quantification non invasive de la fibrose hépatique développé par la société Echosens (Paris, France) dont le fonctionnement repose sur la technique de l'élastométrie impulsionnelle.

Cet examen est indolore et rapide (mois de 5 minutes) et facilement réalisé au lit du malade ou en consultation, avec un résultat immédiat. Cette méthode est performante pour le diagnostic d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose et pour prédire les complications associées à la maladie hépatique. Cependant ses limites sont l'applicabilité, la reproductibilité et l'influence d'autres facteurs que la fibrose sur l'élasticité du foie.

Selon les recommandations de la société EchoSens, le FibroScan ne doit pas être réalisé chez femmes enceintes, les patients ayant des dispositifs implantables actifs (pacemaker) et les patients ayant une ascite. La présence d'ascite est susceptible d'empêcher l'obtention de mesures valides.

III-1. Caractéristiques techniques.

Le FibroScan génère les vibrations d'amplitude modérée et à basse fréquence (50 Hz) induisant des ondes de cisaillement qui se propagent à travers le parenchyme hépatique. La mesure au moyen d'un transducteur ultrasonore de la vitesse de propagation de cette onde à travers le parenchyme hépatique permet d'estimer l'élasticité du foie à l'aide d'une équation $E = 3\rho V^2$ (E -l'élasticité, ρ la densité (constante pour les tissus) et V la vitesse de propagation de l'onde) (Sandrin, Fourquet et al. 2003). La vitesse est corrélée à l'élasticité du foie: plus rigide est le parenchyme, plus rapide est la propagation des ondes (de Ledinghen and Vergniol 2008).

L'examen s'effectue chez un malade à jeun de préférence en position allongée en décubitus dorsal, le bras droit sous la tête pour dégager l'hypochondre droit. Après application de gel sur la peau, la sonde est positionnée par l'opérateur au niveau d'un espace intercostal en regard du lobe droit du foie (en pleine matité). L'emplacement le plus fréquent de la sonde est celui où la PBH devrait être effectuée (à l'intersection entre la ligne xiphoïde et la ligne axillaire moyenne). L'opérateur, assisté par une image échographique en temps-mouvement, localise une partie du foie et prend des mesures. Dix mesures valides sont nécessaires. Seules les ondes dont la vitesse est constante dans le parenchyme hépatique sont validées par l'appareil ce qui permet d'éliminer les artefacts liés à la présence d'une structure vasculaire ou d'une lésion focale. Quand une mesure est considérée comme invalide, elle est automatiquement déchargée. Le résultat est

exprimé en kiloPascals (kPa) et correspond à la médiane de 10 mesures valides. Les valeurs sont comprises entre 2,5 et 75 kPa. (Castera, Forns et al. 2008) avec valeurs normales (foie sain) ~ 5,5 kPa (Roulot, Czernichow et al. 2008).

Actuellement, trois sondes sont disponibles: "*Small*" (S), "*Median*" (M) et "*Extra-Large*" (XL). La sonde S est utilisée pour la réalisation de FibroScan en pédiatrie et la sonde M chez les patients adultes avec le poids normal. La sonde XL a été développée pour mesurer l'élasticité du foie chez les sujets ayant un surpoids (IMC ≥ à 25 kg/m^2 et < à 35 kg/m^2) ou une obésité (IMC> à 35 kg/m^2).

Le volume exploré par la sonde M correspond à un cylindre d'1 cm de diamètre sur 4 cm de long, débutant à 2,5 cm de distance de la surface de la peau, ce qui correspond à un fragment 100 fois plus à celui de PBH.

La sonde XL permet de mesurer l'élasticité dans le même volume que la sonde M (4 cm³), mais plus profondément, à partir de 3,5 cm de la surface de la peau jusqu'à 7,5 cm de profondeur dans le parenchyme hépatique. La différence technique entre les sondes M et XL comprend la fréquence (3.5 *vs* 2.5 MHz), l'amplitude de vibration (2 *vs* 3 mm), le diamètre de leur extrémité (9 *vs* 12 mm) et la profondeur de mesure à partir de la surface de la peau (25 - 65 *vs* 35-75 mm) (Figure 4).

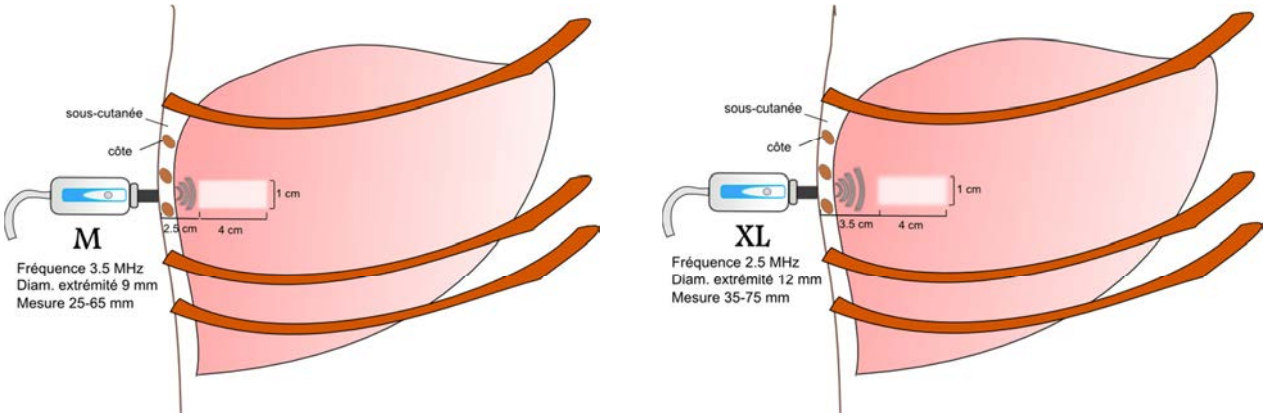


Figure 4. Les caractéristiques techniques de la sonde M et XL de FibroScan.

III-2. Limitations de l'élastographie impulsionnelle

L'élastographie impulsionnelle par le FibroScan a des limites à l'utilisation suivantes : les examens non interprétables, la variabilité inter-observateur et la présence de facteurs confondants qui peuvent surestimer le stade de fibrose du foie.

III-2-1. Applicabilité

L'applicabilité de l'élastographie est basée sur l'évaluation de 3 critères suivants:

- le nombre total de mesures valides;
- le rapport entre l'intervalle interquartile ("*Inter-Quartil Range*" - IQR) et la valeur médiane de l'élasticité hépatique;
- le taux de réussite (TdR), défini comme nombre de mesures valides par rapport au total des mesures réalisées.

Le résultat de FibroScan est considéré interprétable si tous ces critères sont réunis: 10 mesures valides; le rapport IQR/Médiane<30% et le TdR>60% (Poynard, Ingiliz et al. 2008). L'examen est considéré non applicable si ces 3 critères ne sont pas respectés (résultat non interprétable) ou s'il n'y a pas de mesures valides (échec) (Castera, Goutte et al. 2012).

L'applicabilité est une des principales limites de l'élastographie impulsionnelle. Le taux de non applicabilité avec la sonde M est environ de 20% des cas (16% des examens non interprétables et 4% d'échec de mesures). L'inexpérience de l'opérateur et le fait d'avoir une obésité (IMC > 30 kg/m²), un diabète, une hypertension artérielle ou d'être âgé de plus de 52 ans ont été les facteurs indépendamment associés à la non- interprétabilité de l'élastographie impulsionnelle dans une étude qui a évalué plus de 13,000 examens (Castera, Foucher et al. 2010). Des résultats similaires sur l'applicabilité de l'élastographie hépatique ont été rapportés chez les patients diabétiques de type 2 (de Ledinghen, Vergniol et al. 2012).

L'association entre la non applicabilité de cet examen non invasif et la présence de facteurs métaboliques entraîne un problème majeur pour l'utilisation de l'élastographie chez les patients ayant une NAFLD. L'obésité ne représente pas un obstacle pour la réalisation de cet examen, c'est plutôt l'épaisseur de la paroi thoracique qui est en cause et plus particulièrement l'épaisseur de la couche graisseuse qui amortit les ondes et réfléchit les ultrasons nécessitant l'optimisation de la sonde M.

La sonde XL a été développée pour améliorer l'utilisation de FibroScan chez les patients ayant une NAFLD, souvent associée à un syndrome métabolique. Plusieurs études ont évalué la faisabilité de FibroScan réalisé avec les sondes M et XL dans cette population.

La sonde XL a permis de résoudre 60% des examens non interprétables dans une étude qui a évalué l'applicabilité de l'élastographie par les deux sondes chez les patients ayant une obésité caractérisée par un IMC > 30 Kg/m² (de Ledinghen, Vergniol et al. 2010) et chez 276 patients ayant une maladie chronique du foie associée à un IMC > 28 kg/m². Dans cette étude la

sonde XL a eu un taux plus bas d'échec (1.1% versus 16%; p < 0.0001) et un taux plus élevé d'examens interprétables (73% versus 50%; p < 0.0001) par rapport à la sonde M (Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude qui a évalué les patients ayant une NAFLD (Friedrich-Rust, Hadji-Hosseini et al. 2010). Les mesures réalisées par les deux sondes étaient bien corrélées et l'élasticité du foie était, en moyenne, de 1.0 kPa plus basse par la sonde XL dans ces études. L'applicabilité de l'élastographie impulsionnelle peut être améliorée par l'utilisation de la sonde XL (de Ledinghen, Wong et al.; Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012; Wong, Vergniol et al. 2012).

III-2-2. Effet operateur

L'effet operateur a été initialement démontré dans une étude qui a évalué la concordance entre deux marqueurs non-invasifs, le FibroScan et le FibroTest, chez les patients atteints d'une maladie chronique du foie (Poynard, Ingiliz et al. 2008). L'opérateur non expérimenté avait un taux de résultats non interprétables supérieur à ceux d'opérateurs expérimentés (36% versus 29%; $p < 0.01$). La concordance FibroScan/FibroTest était également moins bonne lorsque le FibroScan a été réalisé par l'opérateur non expérimenté que lorsqu'il a été réalisé par un opérateur expérimenté (AUROC 0.70 *vs* 0.80; $p < 0.01$).

Castera et al. ont réalisé une étude prospective pour évaluer plus de 13,000 examens de FibroScan. Ils ont démontré que l'expérience de l'operateur était l'un des facteurs indépendamment associés à la non applicabilité de l'élastographie du foie (Castera, Foucher et al. 2010).

III-2-3. Reproductibilité

La reproductibilité d'un examen est aussi important que son applicabilité dans la pratique clinique. Les premières études ont rapporté une excellente reproductibilité intra- et inter-observateurs et l'apprentissage rapide de la technique de FibroScan (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007) (Boursier, Konate et al. 2008). Le taux de variabilité inter- et intra- observateur de l'élastographie a été très faible chez les patients ayant une maladie chronique du foie (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007). L'examen a été réalisé deux fois par chacun des deux operateurs expérimentés chez les 200 patients inclus. Ces auteurs ont décrit un excellent coefficient de corrélation intra-classe de 0.98 (95% IC 0.977- 0.987) dans les 800 examens réalisés. L'obésité et les stades de fibrose minime (score de METAVIR F<2) ont été associés à un taux plus élevé de discordance entre les opérateurs. D'autres auteurs ont rapporté des résultats similaires pour l'évaluation de la variabilité inter-observateur de l'élastographie hépatique réalisée par 4

opérateurs chez 46 patients (Boursier, Konate et al. 2008). En revanche, cette étude a démontré une discordance d'au moins un stade de fibrose chez 25% des patients.

D'autres publications plus récentes ont contredit ces résultats (Neukam, Recio et al. 2010; Roca, Resino et al. 2012). Ces études ont évalué l'élastographie chez les patients infectés par le VIH, co-infectés ou pas par le VHC, et ils ont rapporté entre 20-30% de discordance d'au moins un stade de fibrose entre les examens réalisés par les deux opérateurs expérimentés. L'une de ces études a démontré une discordance de 2.0 kPa et de 10. kPa entre des examens répétés par deux opérateurs expérimentés chez 27% et 5% des patients, respectivement (Roca, Resino et al. 2012).

Une étude de l'équipe a démontré une variabilité considérable associée à la position de la sonde par rapport à l'espace intercostal choisi pour la mesure (Ingiliz, Chhay et al. 2009).

III-2-4. Facteurs confondants

L'augmentation de l'élasticité du foie non associée à la présence de fibrose peut représenter une surestimation du stade de fibrose hépatique et par conséquente un résultat faux positif de FibroScan. Toutes les conditions susceptibles de modifier la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement seront susceptibles de modifier l'élasticité. La présence d'une activité nécrotico-inflammatoire, cholestase extra-hépatique, péliose, thromboses de vaisseaux, bloc supra-hépatique d'un foie-cardiaque et la prise de repas sont les facteurs plus souvent associés à une surestimation d'élasticité de foie.

Certaines publications ont démontré que chez les patients avec l'hépatite aiguë cytolytique, l'élasticité du foie était augmentée puis diminuait à mesure que les transaminases se normalisaient (Sagir, Erhardt et al. 2008) (Arena, Vizzutti et al. 2008). La même observation a été faite au cours de réactivation virale B (Coco, Oliveri et al. 2007; Wong, Wong et al. 2009).

Plusieurs études ont démontré une corrélation positive entre la concentration sérique des transaminases et l'élasticité du foie chez les patients ayant une hépatite chronique B (Fung, Lai et al. 2010; Fung, Lai et al. 2011) ou C (Vispo, Barreiro et al. 2009). Une étude a montré que la valeur médiane de l'élastographie hépatique était plus élevée chez les patients infectés par le VHB en ayant des transaminases 2 x LSN par rapport à ceux qui avaient des transaminases normales (9.5 versus 4.7 kPa, $p>0.001$) (Fung, Lai et al. 2010). Les mêmes auteurs ont confirmé ces résultats en mesurant l'élasticité du foie avant et trois mois après le début d'un traitement à cause d'une réplication virale chez des patients infectés par le VHB (Fung, Lai et al. 2011). Dans cette étude, la mesure de l'élasticité hépatique trois mois après le début du traitement, quand les

transaminases étaient déjà normalisées, a été significativement inférieure à celle réalisée avant le traitement, au moment d'une inflammation hépatique active (6.4 vs 7.9 kPa, de façon respective; $p<0.001$), dans un délai peu compatible avec une régression de la fibrose.

Des résultats similaires ont été décris dans l'hépatite chronique C. La mesure de l'élastographie était inférieure chez les patients ayant une activité nécrotico-inflammatoire importante (METAVIR A ≥ 2) par rapport à ceux qui avaient une inflammation minime (14.6 kPa versus 6.2 kPa, $p=0.04$) chez les patients qui avaient une fibrose sévère (METAVIR ≥ 3) (Vispo, Barreiro et al. 2009). Tous les biomarqueurs qui utilisent les transaminases dans leur formule pour estimer la fibrose du foie sont susceptibles d'être influencés par la présence d'une activité nécrotico-inflammatoire importante.

La cholestase extra-hépatique et la congestion vasculaire augmentent l'élasticité du foie indépendamment de la fibrose. Deux études ont démontré que les concentrations de bilirubine étaient bien corrélées aux valeurs d'élasticité hépatique en présence d'une lithiase cholédocienne (coefficient de corrélation de Spearman $r=0.67$ et 0.69, $p \leq 0.05$, de façon respective). Ces études ont démontré une diminution significative de l'élasticité hépatique après le drainage des voies biliaires. La mesure de l'élasticité du foie est passée de 10.8 à 7.1 kPa et de 7.6 à 5.4 kPa dans ces études (Millonig, Reimann et al. 2008; Trifan, Sfarti et al. 2011). La congestion hépatique à cause d'une décompensation cardiaque droite est un facteur de surestimation de la fibrose hépatique par l'élastographie transitoire. Initialement, un cas clinique a décrit une réduction dramatique de l'élasticité du foie après transplantation cardiaque d'un patient qui avait une insuffisance cardiaque en phase terminale (44.3 vs 3.8 kPa; $p< 0.0001$) (Lebray, Varnous et al. 2008). Dans une étude plus récente, l'élasticité du foie a diminué pendant l'hospitalisation après l'optimisation du traitement de patients qui avaient une insuffisance cardiaque décompensée à l'inclusion (Colli, Pozzoni et al. 2010).

L'élasticité hépatique était bien corrélée à la concentration sérique de bilirubine totale chez les patients ayant une lithiase cholédocienne. En outre, la mesure de l'élasticité du foie diminuait significativement après drainage des voies biliaires (Millonig, Reimann et al. 2008). En plus, un impact de l'insuffisance cardiaque décompensée avec une congestion vasculaire hépatique secondaire sur l'élastographie transitoire a été également démontré (Lebray, Varnous et al. 2008; Colli, Pozzoni et al. 2010).

La période post prandiale augmente aussi l'élasticité du foie indépendamment du stade de fibrose. Différentes études ont démonté un pic de l'élasticité hépatique entre 15 et 45 minutes

après la prise de repas avec retour au niveau basal deux à trois heures plus tard (Mederacke, Wursthorn et al. 2009; Arena, Lupsor Platon et al. 2013; Berzigotti, De Gottardi et al. 2013).

Selon quelques études la stéatose pourrait influencer l'estimation de la fibrose hépatique par l'élastographie. Une étude asiatique portant un faible effectif a mis en évidence une influence de la stéatose sur la mesure de l'élasticité du foie indépendamment du stade de fibrose (Kim, Choi et al. 2007). D'autres auteurs ont décrit un taux de variabilité inter-observateur plus élevé chez les patients qui avaient une stéatose à l'histologie du foie (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007).

III-3. Performance diagnostique de l'élastographie

III-3-1. Méthodologie dans l'évaluation de la performance diagnostique

La performance diagnostique des méthodes non invasives de fibrose est définie par la mesure l'aire sous la courbe ROC (en anglais "*area under the receiver operating characteristic curve*", AUROC), comprise entre 0,5 et 1. Plus la valeur est proche de 1, meilleure est la performance diagnostique. La PBH est considérée actuellement comme un *gold standard* pour le diagnostic de fibrose dans les différentes maladies hépatiques. Il faut prendre en compte la prévalence de la fibrose (appelée "*spectrum effect*") et le fait que la PBH n'est pas dichotomique (oui *vs* non). (Lambert, Halfon et al. 2008).

L'ajustement des AUROCs par la mesure d'Obuschowski prend en compte le *"spectrum effect"* et la classification ordinale des stades de fibrose par la PBH (Obuchowski 2006). Cette méthode est une version multinominale des courbes ROCs avec plusieurs (N) catégories de la référence, par exemple dans le cas de la PBH N=5 catégories METAVIR (F0, F1, F2, F3 et F4). Ainsi, l'AUROC ajusté par la mesure d'Obuchowski, en anglais "*weighted AUROC"* (wAUROC) est une moyenne pondérée de N(N-1)/2 des différents AUROCS correspondant à toutes les comparaisons deux-par-deux entre les N catégories.

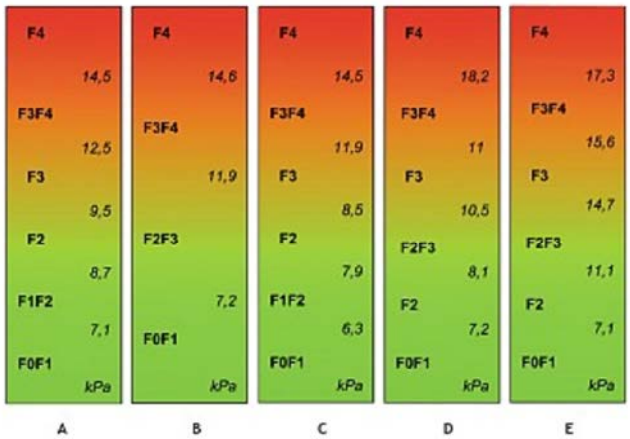
L'importance d'utilisation de la mesure d'Obuchowski pour ajuster les AUROCs au cours de la validation d'un marqueur non invasif a été démontrée par plusieurs études. La définition retenue de la fibrose avancée a un fort impact dans la performance diagnostique. Dans une étude, les AUROCs pour la performance du FibroTest ont varié de 0.67 à 0.98 en fonction de la définition de fibrose avancée (F2) *vs* non avancé (F1) (Poynard, Halfon et al. 2007). La valeur d'AUROC la plus faible (0.67) a été observée lorsque que le stade F2 était défini comme fibrose avancée et le stade F1 comme non avancée (F1 *vs* F2). En revanche, la meilleure performance du test (AUROC de 0.98) a été observée lorsque les auteurs ont comparé les stades

F0 (défini comme fibrose non avancée) versus F4 (fibrose avancée). La conclusion de cette étude portant sur un marqueur non invasif peut s'appliquer à n'importe quel marqueur non invasif de fibrose hépatique.

L'impact de la prévalence de la fibrose sur la performance diagnostique de l'élastographie a été évalué dans une étude (Poynard, de Ledinghen et al. 2011). Dans cette étude les auteurs ont évalué la performance de FibroScan dans une population de patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) et groupe de contrôle de volontaires sains. L'AUROC pour le diagnostic d'une fibrose avancée, définie par F2F3F4 de score METAVIR, était significativement plus faible chez les patients porteurs du VHC que dans l'analyse de l'ensemble de la cohorte incluant les patients et volontaires sains (0.761 versus 0.830, $p<0.001$). Dans ce dernier cas, la proportion de sujets sans fibrose (F0) était augmentée par les volontaires sains, ce qui a changé la prévalence de la fibrose. Les wAUROCs étaient similaires dans ces deux populations différentes (0.883 pour les patients VHC *vs* 0.894 pour la population de patients atteints du VHC plus les volontaires sains). Cela montre la puissance de la mesure d'Obuchowski pour surmonter le biais du "*spectrum effect*" dans l'analyse d'un test diagnostic.

III-3-2. Performance diagnostique d'élastographie dans les hépatopathies chroniques.

La valeur diagnostique de FibroScan et ses seuils des différents stades de fibrose ont été établis en utilisant la PBH comme référence. Cependant, dans la plupart des études, les auteurs n'ont pas fait l'ajustement des AUROCs pour la mesure d'Obuschowski. Par conséquent, la performance diagnostique de FibroScan a été influencée par la prévalence de la fibrose dans chaque étude et le fait que la PBH n'est pas dichotomique (Lambert, Halfon et al. 2008). Différents seuils ont été décris par les auteurs en fonction de la maladie hépatique (Figure 5).



Concordance entre les valeurs d'élasticité hépatique (kPa) et les stades de fibrose selon METAVIR : (A) Hépatite C ; (B) co-infection VHC-VIH ; (C) récidive virale C après transplantation hépatique ; (D) hépatite B ; (E) maladies cholestatiques chroniques.

Figure 5. Signification clinique des seuils d'élasticité hépatique au cours des maladies chroniques du foie. (D'après Lédinghen V, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 2006;41:175-9.)

Un des problèmes posés jusqu'à présent est la variabilité des seuils. Une méta-analyse à partir de 50 études (Friedrich-Rust, Ong et al. 2008) qui a inclus plusieurs milliers de patients a retenu un seuil de 7,6 kPa pour le diagnostic de fibrose significative et de 13 kPa pour le diagnostic de cirrhose (AUROC 0,84 pour le diagnostic de fibrose significative et de 0,94 pour le diagnostic de cirrhose).

En général, la mesure de l'élasticité est fortement corrélée aux stades de fibrose estimés par la classification histologique de METAVIR (1994). Les AUROCs varient entre 0.79 et 0.92 pour le diagnostic d'une fibrose avancée (METAVIR F≥2) et entre 0.89 et 0.98 pour le diagnostic d'une cirrhose (METAVIR F=4), en fonction de l'étiologie de la maladie hépatique (Tableau 4).

Tableau 4. La performance diagnostique d'élastographie pour le diagnostic d'une fibrose (F≥2) ou d'une cirrhose (F4) chez les patients atteints d'une maladie chronique du foie.

Auteurs	**n**	**Étiologies**	**Fibrose avancée (F≥2) AUROC**	**Cirrhose (F≥4) AUROC**
Arena, Vizzutti et *al.* (2008)	150	VHC	0.91	0,98
Ziol, Handra-Luca et *al.* (2005)	251	VHC	0.79	0.97
Castera, Vergniol et *al.* (2005)	183	VHC	0.83	0.95
de Ledinghen, Douvin et *al.* (2006)	72	VHC-VIH	0.72	0.97
Vergara, Macias et *al*. (2007)	169	VHC-VIH	0.83	0.94
Carrion, Navasa et *a*l.(2006)	124	VHC transplanté	0.90	0.98
Rigamonti, Donato et *al.* (2008)	90	VHC transplanté	0.78	0.90
Marcellin, Ziol et *al.* (2009)	173	VHB	0.81	0.93
Fung, Lai et *al*. (2010)	129	VHB	0.87	0.89
Miailhes, Pradat et *al*. (2011)	57	VHB-VIH	0.85	0.96
Myers, Elkashab et *al.* (2010)	251	Hépatites virales	0.74	0.94
Corpechot, El Naggar et *al.* (2006)	95	Maladies cholestatiques	0.92	0.96
Gomez-Dominguez, Mendoza et *al.* (2008)	94	CBP	0.89	0.94
Corpechot, Carrat et *al.* (2012)	103	CBP	0.91	0.99
Foucher, Chanteloup et *al.* (2006)	354	Toutes	0.80	0.96
Gomez-Dominguez, Mendoza et *al.* (2006)	94	Toutes	0.74	0.94
Fraquelli, Rigamonti et *al.* (2007)	200	Toutes	0.86	0.90
Ganne-Carrié et *al.* (2006)	775	Toutes	-	0.95
Wong, Wong et *al.* (2008)	133	Toutes	-	0.89

AUROC, area under de receiver operator curve; CBP, cirrhose biliaire primitive; VIH, virus de l'immunodéficience humaine; VHB, virus de l'hépatite B; VHC, virus de l'hépatite C.

La performance diagnostique d'élastographie a été aussi validée par différentes méta-analyses (Tableau 5). Dans deux méta-analyses réalisées par notre équipe (Poynard, de Ledinghen et al. 2011; Poynard, Ngo et al. 2011), cette performance a été évaluée par des AUROCs ajustés par la méthode d'Obuchoswki (wAUROC), qui prend en compte la prévalence de la fibrose et le fait que le résultat de la biopsie hépatique est une variable non-dichotomique ordinale.

Tableau 5. La performance diagnostique d'élastographie évaluée par des méta-analyses.

Auteurs	Étiologies	Etudes	n	wAUROC	F≥2 AUROC	F=4 AUROC
(Shaheen, Wan et al. 2007)	VHC	4	546		0.83 (0.03-1.00)	0.95 (0.87-0.99)
(Poynard, Ngo et al. 2011)	VHB	5	618	0.89 (0.83-0.96)	-	-
(Poynard, de Ledinghen et al. 2011)	VHC	3	1289	0.88 (0.87-0.89)	-	-
(Bota, Herkner et al. 2013)	Toutes	13	1163		0.85 (0.82-0.88)	0.93 (0.91-0.95)

AUROC, *area under de receiver operator curve*; VHB, virus de l'hépatite B; VHC, virus de l'hépatite C.

III-3-3. Performance diagnostique d'élastographie dans la NAFLD

Plusieurs études ont évalué l'élastographie pour l'estimation de la fibrose hépatique chez les patients ayant une NAFLD avec la PBH comme référence. Comme observé pour les autres maladies chroniques du foie, cette méthode a une bonne performance pour le diagnostic d'une fibrose avancée (F≥2), avec des AUROCs entre 0.79 et 0.99 et pour le diagnostic d'une cirrhose (F=4) avec des AUROCs de 0.94 à 0.99. La plus grande limitation pour l'utilisation de l'élastographie chez les patients ayant une NAFLD en pratique clinique est le taux élevé d'échec (aucune mesure valide) ou des résultats non interprétables, allant de 3,8 à 50% (Tableau 6). La validation de la méthode a des certaines points faibles, car les études ont été réalisées sur des populations hétérogènes et inhabituelles (par exemple : des patients asiatiques avec un IMC <28 kg/m^2), le nombre de patients inclus <100 avec le taux bas des patients cirrhotiques, l'utilisation des classifications histologiques différentes (Kleiner, Brunt et al. 2005) et (Brunt, Janney et al. 1999).

Tableau 6. La performance diagnostique de l'élastographie pour le diagnostic d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose chez les patients ayant une NAFLD prouvé histologiquement.

Auteurs	n	Classification histologique	Seul (kPa)		AUROC	Echec ou résultat non interprétable (%)
Yoneda *et al.* (2008)	97	Brunt	F≥2 F4	6.6 17.5	0.86 0.99	4.9
Nobili *et al.* (2008)	50	Brunt	F≥2 F4	7.4 -	0.99 -	3.8
Wong *et al.* (2010)	246	Kleiner	F≥2 F4	7.0 10.3	0.84 0.95	10.2
Lupsor *et al.* (2010)	65	Brunt	F≥2 F4	6.8 -	0.79 -	9.7
Petta *et al.* (2011)	146	Kleiner	F≥2 F4	7.2 -	0.79 -	14
Gaia *et al.* (2011)	72	Brunt	F≥2 F4	7.0 10.5	0.80 0.94	8
Myers *et al.* (2012)	75	Kleiner	F≥2 F4	7.8 22.3	0.86 0.88	50
Wong *et al.* (2012)	129	Kleiner	F≥2 F4	7.0 10.3	0.83 0.89	33

AUROC, *area under the receiver operator curve*, kPa; KiloPascals (Adapté de Castera 2013 - Nature reviews)

Les sondes M et XL ont la performance diagnostique similaires confirmée par plusieurs études (Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012; Wong, Vergniol et al. 2012). La sonde XL était plus performante dans "l'analyse d'intention de traiter" à cause du taux plus élevé de non applicabilité avec la sonde M chez les patients ayant un syndrome métabolique (Tableau 7).

Dans l'étude réalisée chez les 193 patients atteints de la NAFLD, le taux d'échec de la sonde XL était significativement inférieur à celui de la sonde de M (2% *vs* 10%, respectivement, p = 0,002), mais le taux de résultats non interprétables de deux sondes ne différaient pas de façon significative (25% *vs* 33%, respectivement, P = 0,093) (Wong, Vergniol et al. 2012).

Comme la valeur de l'élasticité était inférieure avec la sonde XL par comparaison avec la sonde M, des seuils différents pour les deux sondes ont été proposés: 6.2 kPa (XL) et 7.0 kPa

(M) pour un stade de fibrose F ≥ 2; 7.9kPa (XL) et 10.3 kPa (M) pour le diagnostic d'une cirrhose (F=4) (Wong, Vergniol et al. 2012).

Tableau 7. La performance diagnostique des sondes M et XL d'élastographie pour le diagnostic d'une fibrose avancée (F≥2) ou d'une cirrhose (F4) chez les patients ayant une NAFLD prouvé histologiquement.

Auteurs	*n*	BMI (kg/m^2)	Classification histologique	Fibrose	Sonde	Seuil (kPa)	AUROC
Friedrich-Rust *et al.* (2012)	37	27.5 (21.1-40.4)	Kleiner	F≥2	M	-	0.80
				F4		-	0.93
				F≥2	XL	-	0.82
				F4		-	0.93
Myers *et al.* (2012)	75	30.0 (28-53)	Kleiner	F≥2	M	7.8	0.86
				F4		22.3	0.88
				F≥2	XL	6.4	0.90
				F4		14.0	0.95
Wong *et al.* (2012)	193	28.9±4.8	Kleiner	F≥2	M	7.0	0.83
				F4		10.3	0.89
				F≥2	XL	6.2	0.80
				F4		7.9	0.91

AUROC, *area under the receiver operator curve*, kPa; KiloPascals (Adapté de Castera 2013 - Nature reviews)

III-4. Valeur pronostique d'élastographie.

L'évaluation du stade de fibrose hépatique est essentielle dans une prise en charge optimale des patients ayant une maladie chronique du foie. L'hypertension portale, l'ascite ou le carcinome hépatocellulaire sont des complications de la cirrhose qui peuvent en entrainer une réduction de la survie globale (2012).

L'élastographie du foie a été validée pour la prédiction des complications hépatiques et de la mortalité globale et d'origine hépatique. Plusieurs études ont rapporté la valeur pronostique de l'élastographie hépatique pour prédire la décompensation de la cirrhose et l'incidence du carcinome hépatocellulaire chez les patients ayant une hépatite chronique virale (Masuzaki, Tateishi et al. 2009; Jung, Kim et al. 2011; Chon, Jung et al. 2012). Cet examen non-invasif a une bonne performance pour prédire des complications hépatiques graves et de la mortalité

globale et d'origine hépatique (Singh, Fujii et al. 2013). Une des ses limitations est l'applicabilité réduite surtout chez les patients ayant une ascite. Cet examen permet aussi de prédire la mortalité globale chez les patients ayant une hépatite chronique B (Kim, Lee et al. 2012) et C (Vergniol, Foucher et al. 2011). Cette valeur pronostique a aussi été validée dans d'autres maladies hépatiques chroniques comme la cirrhose biliaire primitive (Corpechot, Carrat et al. 2012) ou l'hémochromatose (Adhoute, Foucher et al. 2008).

La principale conséquence de la progression de la fibrose au stade de cirrhose est le développement de l'hypertension portale associée à des complications graves comme l'ascite ou l'hémorragie digestive due à la rupture de varices œsophagiennes (Liou 2014). Les méthodes de référence pour le diagnostic d'une hypertension portale ou des varices œsophagiennes sont le gradient de pression veineuse hépatique (GPVH) et l'endoscopie digestive, de façon respective (Ripoll, Groszmann et al. 2007; Thabut, D'Amico et al. 2010). Ces méthodes étant invasives, plusieurs auteurs ont évalué la performance de l'élastographie hépatique pour le diagnostic d'une hypertension portale. Initialement, les seuils 27.5 kPa; 37.5 kPa; 49 kPa; 54 kPa et 63 kPa ont été proposés pour la prédire de façon respective les varices œsophagiennes; un score de Child-Pugh B ou C; une ascite; un carcinome hépatocellulaire et une hémorragie digestive par rupture de varices œsophagiennes (Foucher, Chanteloup et al. 2006).

Plus récemment, une étude de l'équipe a validé l'élastographie hépatique pour la prédiction des complications chez les patients ayant une cirrhose. Ce travail a proposé différents seuils de l'élastographie pour identifier les patients cirrhotiques à haut risque de complications sévères (Poynard, Vergniol et al. 2013).

Plusieurs publications ont rapporté différents seuils et différentes performances pour la détection d'une hypertension portale cliniquement significative (GPVH $\geq$ 10 mmHg) par l'élastographie hépatique chez les patients ayant des maladies chroniques du foie. Les différents seuils de l'élastographie ont varié de 13.6 kPa à 34.9 kPa et les AUROCs de 0.79 à 0.99 pour la prédiction de l'hypertension portale (Tableau 8). Différents critères de jugement de l'hypertension portale ont été considérés dans ces études et certaines d'entre elles avaient de faibles effectifs. Une étude a rapporté les seuils de 55 kPa et 53 kPa de l'élasticité de la rate pour la prédiction de varices œsophagiennes et de GPVH $\geq$ 10 mmHg (Colecchia, Montrone et al. 2012). Ce résultat obtenu doit être validé par d'autres études, d'autant que l'élastographie a une valeur maximale de 75 kPa que l'élasticité de la rate est plus élevée que celle du foie et que dans cette étude de nombreux patients atteignent la valeur maximale de la méthode.

Tableau 8. La performance de l'élastographie hépatique pour la prédiction de l'hypertension portale.

Auteurs	Etiologie	n	Hypertension Portale	Seuil (kPa)	AUROC
(Kazemi, Kettaneh et al. 2006)	Toutes	165	VO	13.9	0.83
(Vizzutti, Arena et al. 2007)	VHC	61	GPVH ≥ 10 mmHg	13.6	0.99
		61	GPVH ≥ 12 mmHg	17.6	0.92
		47	VO	17.6	0.76
(Bureau, Metivier et al. 2008)	Toutes	150	GPVH ≥ 10 mmHg	21.0	0.94
		89	VO	21.1	0.85
(Lemoine, Katsahian et al. 2008)	VHC	44	GPVH ≥ 10 mmHg	20.5	0.76
(Lemoine, Katsahian et al. 2008)	Maladie alcoolique	48	GPVH ≥ 10 mmHg	34.9	0.94
(Castera, Le Bail et al. 2009)	VHC	70	VO	21.5	0.84
(Sanchez-Conde, Montes-Ramirez et al. 2010)	VIH/VHC	38	GPVH ≥ 10 mmHg	14.0	0.80
		38	GPVH ≥ 12 mmHg	23.0	0.80
(Malik, Lai et al. 2010)	Toutes	124	VO	20.0	0.85
(Pritchett, Cardenas et al. 2011)	Toutes	211	VO	19.5	0.74
(Colecchia, Montrone et al. 2012)	VHC	100	VO	25.0	0.90
			GPVH ≥ 10 mmHg	24.2	0.92

AUROC, *area under the ROC curve*; GPVH, gradient de pression veineuse hépatique; VHC, virus de l'hépatite C; VIH, virus de l'immunodéficience humaine; VO, varices œsophagiennes.

En conclusion l'élastographie hépatique est une méthode simple, rapide, non-invasive, validée pour l'évaluation de la fibrose hépatique dans les hépatopathies chroniques. Cet examen a une bonne performance diagnostique d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose ainsi que pour la prédiction de la mortalité globale et des complications associées à la maladie du foie. Cependant, cet examen doit être réalisé par un opérateur expérimenté et le résultat doit être interprété par un médecin spécialiste prenant en compte l'étiologie de la maladie hépatique, les conditions d'interprétabilité de résultat ainsi que les limitations d'applicabilité de cet examen.

Chapitre IV. Biomarqueurs non-invasifs de stéatose

La stéatose hépatique augmente le risque d'avoir une fibrose hépatique et une cirrhose (Fassio, Alvarez et al. 2004). La stéatose hépatique est aussi associée à l'insulinorésistance hépatique et elle peut accélérer le développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Vuppalanchi and Chalasani 2009; Targher, Day et al. 2010).

Différents marqueurs non-invasifs de stéatose ont été proposés. (Tableau9).

Tableau 9. Marqueurs non-invasifs de stéatose.

Auteur	Nom de score	n	Formule	Résultats	Méthode de diagnostic de stéatose
Poynard T et al.,2005	Steatotest	310 patients 434 (3 groupes de validation)	Formule non divulguée (α2-macroglobuline, haptoglobine, apolipoproteine A1, bilirubine totale, GGT, glycémie à jeun, triglycérides, cholestérol, ALT) ajustés sur l'âge, le sexe, le poids et la taille.	AUROC 0.79 (stéatose >33%); 2 cut-offs: 0.3 et 0.72 Se 90%, Sp 70%,	Biopsie
Bedogni G et al., 2006	Fatty Liver Index (FLI)	216 patients 280 (contrôle)	(e0.953 * Loge(triglyéerides) + 0.139* IMC + 0.718 * Loge(GGT) + 0.053* (tour de taille)-15.745)/(1 + e0.953 * Loge(triglycérides) + 0.139* IMC + 0.718 * Loge(GGT) + 0.053* (tour de taille)-15.745)*100	AUROC 0.84 2 cut-offs, <30 stéatose du foie exclue; >60 stéatose présent Se 87%, 86% Sp	Echographie
Kotronen A et al., 2009,	NAFLD Liver Fat Score	313 patients 157 (validation)	(-2.89 + 1.18 * (syndrome métabolique- oui=1/non=0) +0.45 * (diabète- oui=1/non = 0) + 0.15 * (insulin à jeun, mU/L) + 0.04 * (AST, IU/L) - 0.94 * (AST/ALT))	AUROC 0.87 2 cut-offs: -1.413 et +1.257 Se 86 % et Sp 71%	IRM
Bedogni G et al., 2010,	Lipid Accumulation Product (LAP)	588 patients	(tour de taille - 65) * triglycérides (si homme) (tour de taille - 58) * triglycérides (si femme)	Stéatose × 4.28 pour chaque 1 log	Echographie
Lee JH et al. 2010	L'Hepatic Steatosis Index (HSI)	10 724 patients (5362 NAFLD patients)	HSI = 8 x ALAT/ASAT ratio + IMC + 2 (si diabète) + 2 (si femme)	AUROC 0.81, Se 93.1%, Sp 92.4% 2 cut-offs: < 30 NAFLD exclue > 36 NAFLD présente	Echographie

AUROC, *area under the ROC curve*; Se- sensibilité, Sp- spécificité, NAFLD- stéatose hépatique non-alcoolique, ALT, Alanine aminotransférase; AST, Aspartate aminotransférase ; IMC, indice de masse corporelle ; GGT**,** gamma glutamil transférase.

Le Stéatotest®(Poynard, Ratziu et al. 2005) est un marqueur non-invasif, qui combine neuf paramètres biochimiques (l'alpha2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotéine A1, la

bilirubine totale, la GGT, la glycémie à jeun, les triglycérides, le cholestérol et l'ALT), ajustés sur l'âge, le sexe, le poids et la taille du patient. Le résultat du test varie entre 0.00 et 1.00 et le SteatoTest > 0.69 définit la présence d'une stéatose sévère (>32% des hépatocytes).

Le Stéatotest avec d'autres marqueurs non-invasifs (le FibroTest, l'ActiTest, le NashTest et l'AshTest) fait partie de FibroMax (Biopredicitve, Paris, France). Le FibroMax est un examen breveté qui appartient à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP, Paris, France) et qui a été commercialisé par la société BioPredicitive® (Paris, France). Le FibroMax est réalisable par une simple prise de sang chez un patient à jeun. Le calcul des scores est réalisé à l'aide d'une formule non-divulguée selon des procédures pré-analytiques et analytiques définies (Poynard, Muntenau et al. 2008).

Le Stéatotest a été validée chez 744 patients ayant une maladie chronique du foie de différentes causes et 140 volontaires sains ou donneurs de sang, en prenant comme référence la présence d'une stéatose supérieure à 5 % sur la biopsie hépatique (Poynard, Ratziu et al. 2005). Le groupe d'évaluation initial était composé de 310 patients. Trois groupes de validation (n = 434) étaient composés de patients infectés par le virus de l'hépatite chronique C naïfs de traitement (n=171), après le traitement antiviral (n=201) et des patients ayant une maladie alcoolique du foie (n=62). Pour un seuil de 0,3, la sensibilité du SteatoTest était comprise entre 85 et 100 % ; pour un seuil de 0,7, la spécificité était comprise entre 83 à 100 % pour diagnostiquer la présence d'une stéatose significative (>5%). Le SteatoTest a été validé en utilisant la ponction biopsie du foie comme un examen de référence.

Le test a été performant pour le diagnostic d'une stéatose (>5%), AUROC de 0.80 et pour la détection de la stéatose modérée/sévère (≥33%), AUROC de 0.79. Les AUROC ont varié de 0.72 à 0.86 dans les groupes évalués.

La performance diagnostique du SteatoTest a été validé pour le diagnostic d'une stéatose avancée (>33%) chez 494 patients obèses morbides (BMI>35 kg/m^2) avec une AUROC de 0.80 (95% IC 0.79-0.83) (Poynard, Lassailly et al. 2012).

Le SteatoTest a été également étudié pour le diagnostic d'une stéatose significative (>5%) chez 1909 patients ayant une hyperlipidémie qui sont à risque d'une maladie hépatique avancée (Ratziu, Giral et al. 2007). La prévalence de stéatose significative (>5%) dans cette

population de patients représente 30.1% (569/1893) vs 4.9% (8/164) donneurs de sang ($P < 0.0001$).

Tableau 10. Conversion entre les scores du SteatoTest et le degré de stéatose hépatique estimé par la ponction biopsie.

SteatoTest	Stades de stéatose	% de stéatose des hépatocytes
0.6901-1.0000	S3 Stéatose marquée ou sévère	>32%
0.6701-0.6900	S2-S3	6-32%
0.5701-0.6700	S2 Stéatose modérée	6-32%
0.4801-0.5700	S1-S2	1-5%
0.3801-0.4800	S1 Stéatose minime	1-5%
0.3001-0.3800	S0-S1	< 1%
0.0000-0.3000	S0	< 1%

Fatty Liver Index (FLI) (Bedogni, Bellentani et al. 2006) est un marqueur qui est calculé en prenant en compte l'indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, la concentration sérique de triglycérides et celle de gamma glutamyl transférase (GGT). Le résultat de FLI varie de 0 à 100. Un score FLI < 30 exclut et > 60 confirme la présence d'une stéatose du foie avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 86%.

Le score FLI a été développé par Bedogni et al., pour prédire la stéatose hépatique dans la population générale (*Dionysos Nutrition & Liver Study*) (Bedogni, Bellentani et al. 2006). 216 patients avec la suspicion d'une stéatose hépatique d'origine alcoolique ou métabolique ont été inclus dans cette étude. Le score FLI a été validé en utilisant une échographie abdominale comme un examen de référence.

Les auteurs trouvent que le score FLI a une utilisation clinique possible pour l'identification des sujets pour la réalisation de l'échographie abdominale et des ceux qui doivent modifier leur mode de vie. FLI peut être aussi utilisé pour identifier les sujets à un risque élevé de stéatose hépatique dans les études observationnelles ou interventionnelles.

Récemment, Calori et al. (Calori, Lattuada et al. 2011) ont démontré que le score FLI élevé est associé à la mortalité dans une enquête de population sur 2 011 sujets avec une période d'observation de 15 ans. D'après les données de cette étude, FLI a été associé non seulement à la mortalité hépatique, mais aussi aux maladies cardiovasculaires et à la mortalité lié au cancer non-hépatique, indépendamment de présence de diabète de type 2 ou l'intolérance au glucose et le syndrome métabolique.

Ensuite, une autre étude réalisée chez 1307 sujets non-diabétiques par Gastaldelli et al.(Gastaldelli, Kozakova et al. 2009) a montré que les sujets présentant le score FLI >60 non seulement sont à risque avoir la stéatose hépatique (78%) mais également de développer un diabète de type 2, la coronaropathie et l'athérosclérose.

Lerchbaum et al. (Lerchbaum, Pilz et al. 2013) ont confirmé l'association du FLI à la mortalité globale et à la mortalité cardiovasculaire chez les patients présentant un risque élevé de coronaropathie. Les auteurs ont trouvé une association forte et indépendante entre le FLI et la mortalité non cardiovasculaire, y compris le décès dus à une infection mortelle, le cancer, les mortalité hépatique et d'autres causes indiquant une association de FLI à une mortalité accrue au-delà des facteurs de risque cardio-vasculaires.

Lerchbaum et al. (Lerchbaum, Gruber et al. 2011) ont également réalisé une autre étude chez 611 femmes ayant un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Ils ont démontré que les femmes obèses ayant un SOPK ont un score FLI élevé qui est étroitement lié au syndrome métabolique. Le score FLI pourrait être utile pour identifier les patientes ayant un SOPK à risque élevé d'avoir les troubles métaboliques et hépatiques.

En effet, certaines études ont démontré la corrélation limitée entre FLI et la stéatose hépatique évaluée par la spectroscopie par résonance magnétique (MRS). Une étude a été réalisée par Kahl et al. (Kahl, Strassburger et al. 2014) chez 92 non-diabétiques et non-obèses sujets. Le score FLI a été corrélé à l'insulinorésistance mais il avait une performance diagnostique médiocre pour détecter la stéatose, AUROC de 0,72. Une autre étude réalisée par Guiu et al. (Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012) chez 220 patients atteints de diabète de type 2 a confirmé ces résultats. Ce test a présenté la performance diagnostique insuffisante pour prédire la stéatose hépatique, évaluée par la spectroscopie par résonance magnétique, AUROC de 0.647 (95% CI, 0.58–0.71).

Lipid accumulation product (LAP) a été développé pour prédire le risque cardiovasculaire dans la population américaine en utilisant l'enquête nationale sur l'examen de la santé et de la nutrition (enquête NHANES III) (Kahn 2005). LAP est un marquer qui est basé sur une combinaison de deux facteurs, simples et disponibles en pratique, l'IMC et le taux de triglycérides à jeun. L'analyse transversale de données d'enquête NHANES III a démontré que LAP a été plus performant par rapport à l'IMC pour détecter les facteurs de risque cardio-métaboliques et le diabète (Kahn 2005) (Kahn 2006). LAP a été évalué également comme un

facteur prédictif de mortalité globale chez les patients présentant un risque cardiovasculaire élevé {Ioachimescu, 2010 #34}.

Ensuite, le LAP a été évalué chez 588 sujets pour prédire la stéatose hépatique diagnostiquée par l'échographie abdominale dans la population générale en Italie (*Dionysos Nutrition & Liver Study*) par la même équipe qui a développé le score FLI (Bedogni, Kahn et al. 2010). Les auteurs ont constaté que l'augmentation des valeurs de LAP a été associée à la quantité de stéatose hépatique. Dans l'article original de Kahn et al., le résultat du LAP n'a pas été ajusté sur le sexe (Kahn 2005), contrairement à l'étude réalisée par Bedogni qui a montré un impact du sexe sur les valeurs du LAP. Cet impact peut être expliqué non seulement par l'évaluation des différentes variables (stéatose hépatique vs. facteurs de risque cardiovasculaire), mais aussi par des différentes caractéristiques de populations étudiées.

Le *NAFLD Liver Fat* score (Kotronen, Peltonen et al. 2009) comprend les variables suivantes : la présence d'un syndrome métabolique et du diabète de type 2, la concentration sérique à jeun d'insuline et le taux des transaminases (ALT et AST) pour prédire la stéatose. Ce marqueur sérique a été validé dans une étude portant sur 470 patients en utilisant comme une méthode de référence, l'IRM couplée à la spectroscopie par protons. *NAFLD Liver Fat score* avait une performance diagnostique satisfaisante (AUROC de 0.87) pour prédire une NAFLD, définie comme la présence > 55.6 mg des triglycérides/g dans le tissu hépatique ou 5.56% du poids des hépatocytes. Le seuil à - 0.640 permettait de prédire l'accumulation anormale de graisse hépatique avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 71% (Kotronen, Peltonen et al. 2009). Ces résultats ont été confirmés par une étude indépendante (Wlazlo, van Greevenbroek et al. 2012). Ce score a été testé dans une étude prospective pour évaluer l'incidence du diabète dans une grande cohorte française sur une période de suivie de 9 ans. 1861 hommes et 1950 femmes, non-diabétiques, âgés de 30 à 65 ans ont été inclus. NAFLD-FLS présente AUROC de 0.74 chez homme et 0.83 chez femme. Ce score est une méthode clinique simple pour évaluer la stéatose hépatique et il est facteur prédictif de l'incidence du diabète (Balkau, Lange et al. 2010).

L'Hepatic Steatosis Index (HSI) est un marqueur de stéatose qui prend en compte l'IMC, les concentrations sériques de transaminases et la présence d'un diabète. HSI a été évalué dans une étude transversale chez 10 724 patients inclus. 5362 patients atteints d'une NAFLD diagnostiqué par l'échographie abdominale versus le groupe de contrôle de même âge et sexe. HSI a une performance caractérisée par une AUROC de 0.812 (95% Intervalle de Confiance 0.801-0.824), un score HSI < 30 permet de exclure et un score > 36 de confirmer la NAFLD avec une sensibilité de 93.1% et une spécificité de 92.4%. (Lee, Kim et al. 2010).

IV-1. Performance diagnostic des marqueurs non-invasifs de stéatose.

La performance d'un marqueur non-invasif devrait être basée sur sa précision par rapport à la méthode de référence, son applicabilité et son indépendance par rapport aux facteurs confondants. Le marqueur non-invasif idéal serait applicable et reproductible, avec un risque bas de faux positifs ou faux négatifs.

Tous les marqueurs non-invasifs de stéatose ont été évalués dans les populations différentes et ont été comparés à une méthode de référence différente.

Un seul marqueur, le SteatoTest, a été validé versus la biopsie hépatique comme une méthode de référence. Le panel des marqueurs non-invasifs du FibroMax, dont le SteatoTest fait partie, a été considéré interprétable chez plus de 95% des patients dans une étude de l'équipe qui a analysé plus de 350,000 examens (Poynard, Munteanu et al. 2011). Le marqueur a été considéré comme non interprétable en présence d'une valeur extrême d'un paramètre, en dehors du percentile entre 1% et 99%, qui entraînent une variation d'au moins 0.30 unité du marqueur, soit 1.5 stades. Les causes rares de non applicabilité de cette méthode sont les hépatites aigues et les hémolyses surtout associés à la présence d'une valve cardiaque métallique (Poynard, Munteanu et al. 2011).

Concernant les marqueurs non-invasifs, l'utilisation d'un paramètre exprimé en multiple des valeurs au lieu de la concentration sérique absolue peut entraîner un risque de non reproductibilité à cause d'une variabilité inter-laboratoire. Ce risque a été déjà démontré pour les transaminases dans le dépistage d'une maladie hépatique chez les donneurs de sang et dans la définition d'une hépatite aigüe d'origine médicamenteuse (Piton, Poynard et al. 1998; M'Kada, Munteanu et al. 2011). La méthodologie adoptée pour définir la valeur normale des transaminases n'est pas disponible pour la plupart des laboratoires. Afin de réduire le risque de variabilité inter-laboratoire, les marqueurs non-invasifs doivent utiliser la valeur absolue d'un paramètre, comme les U/L pour les transaminases, au lieu de l'augmentation en nombre de fois par rapport à la limite supérieure de la normale (LSN).

Actuellement, plusieurs marqueurs non-invasifs ont été proposés pour le diagnostic de stéatose hépatique. Certains auteurs ont réalisé la comparaison directe des plusieurs marqueurs non-invasifs dans la même étude pour évaluer la performance diagnostic dans la même population.

Kahl et al.(Kahl, Strassburger et al. 2014) ont réalisé une étude chez 92 patients non-diabétiques et non-obèses pour évaluer la performance de 3 marqueurs non-invasifs (NAFLD Liver Fat Score, HSI et FLI) de détecter la stéatose hépatique et évaluer leur corrélation à la sensibilité à l'insuline et à la sécrétion d'insuline. L'IRM couplée à la spectroscopie par protons était une méthode de référence. Les AUROC de NAFLD-LFS, FLI et HSI étaient 0.70, 0.72, et 0.79, respectivement. La performance diagnostique de trois marqueurs non-invasifs était de 70-80% avec la sensibilité et la spécificité plus faibles par rapport à leur description originale.

Cette étude présente des caractéristiques supplémentaires de ces scores comme les facteurs prédictifs d'insulinorésistance et de la sécrétion d'insuline. Les marqueurs non-invasifs de stéatose évalués offrent une efficacité modeste pour détecter la stéatose et ils ne peuvent pas remplacer une IRM. Cependant, ils pourraient être des paramètres de substitution pour évaluer le contenu hépatique en graisses et aussi pour une estimation clinique d'insulinorésistance et de la sécrétion d'insuline.

Une autre étude réalisée par Meffert et al.,{Meffert, 2014 #70} a évalué la capacité du FLI et du HSI à déterminer un risque individuel de stéatose hépatique dans la population générale (*Study of Health in Pomerania*, SHIP et *the South German Echinococcus Multilocularis and Internal Diseases in Leutkirch study*, EMIL). La population étudiée était composée de 4,222 résidents adultes de Poméranie-Occidentale située au nord-est de l'Allemagne de l'étude SHIP et 2,177 sujets de l'étude EMIL. Une échographie abdominale a été utilisée comme méthode de référence pour le diagnostic de stéatose hépatique.

FLI permet d'identifier les patients atteints de la NAFLD (AUROC = 0.817, *SHIP study*) et (AUROC = 0.890, *EMIL study*). HSI présente les résultats moins performants dans l'analyse de deux base de données (SHIP: AUC = 0.782 et EMIL: AUC = 0.841). Les résultats de cette étude montrent que les marqueurs non-invasifs de diagnostic de la stéatose hépatique sont capables de distinguer le risque relatif d'avoir ou pas la stéatose hépatique. Cependant, aucun des marqueurs n'a été capable d'évaluer systématiquement le risque absolu individuel.

Balkau et al., (Balkau, Lange et al. 2010)ont réalisé une étude pour évaluer la capacité de deux marqueurs non-invasifs : *NAFLD Liver Fat score* et FLI de prédire l'incidence du diabète de type 2 dans une grande cohorte française prospective sur une période de suivie de 9 ans (*Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome, D.E.S.I.R).*1861 hommes et 1950 femmes, non-diabétiques, âgés de 30 à 65 ans ont été inclus dans cette cohorte.

Par rapport aux sujets ayant FLI <20, un odds-ratio ajusté sur l'âge de développer le diabète (95% intervalle de confiance) de FLI ≥ 70 était 9,33 (5,05 à 17,25) pour les hommes et 36,72 (17,12 à 78,76) pour les femmes. Après une analyse multi-variée ceux-ci ont été atténuées à 3,43 (1,61 à 7,28) et 11.05 (4.09 29.81), après ajustement sur le glucose, l'insuline, l'hypertension, la consommation d'alcool, l'activité physique, le tabagisme et les antécédents familiaux de diabète; les odds-ratios ont augmenté à 4,71 (1,68 à 13,16) et 22,77 (6,78 à 76,44) chez ceux qui n'ont pas une consommation excessive d'alcool. NAFLD-FLS a également été capable de prédire l'incidence du diabète, mais avec des odds-ratios beaucoup plus faibles chez les femmes et chez les hommes.

Guiu et al.,(Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012) ont réalisé une étude pour évaluer la performance diagnostique de prédire la stéatose hépatique chez 220 patients atteints de diabète de type 2. Les auteurs ont choisi la SteatoTest, FLI, HSI, l'adiponectine sérique et la protéine de liaison de rétinol 4. L'IRM couplée à la spectroscopie par protons était une méthode de référence. Les valeurs AUC étaient basses pour tous les marqueurs non-invasifs que ça soit le SteatoTest 0.674 (95% CI, 0.608–0.736) le FLI 0.647 (95% CI, 0.58–0.71), ou le HSI 0.637 (95% CI, 0.570–0.701).

Tous les patients diabétiques ayant un IMC> 34 kg/m^2 avaient un HSI> 36 (indiquant la stéatose du foie). Le score HSI prend en compte la présence d'un diabète de type 2 et surestime la présence de stéatose hépatique dans cette population, 96,8% patients évalués ont été classés comme ayant une stéatose. Les auteurs concluent que les marqueurs non-invasifs de stéatose hépatique ne peuvent pas remplacer la spectroscopie par protons pour le moment.

En conclusion, plusieurs marqueurs non-invasifs de stéatose basés sur les différents paramètres anthropométriques et métaboliques ont été publiés.

Les marqueurs non-invasifs disponibles actuellement (SteatoTest, NAFLD-LFS, HSI et LAP) ont démontré une bonne performance diagnostique pour détecter la stéatose hépatique dans leurs études originales. En raison de l'hétérogénéité importante des types de patients inclus et des méthodes de référence utilisées, une validation indépendante est importante avant de recommander ces marqueurs pour l'utilisation en pratique clinique ou celle de recherche.

Chapitre V.

***Article 1:* "A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver".**

V-1. Objectifs du travail

La stéatose hépatique non alcoolique (*non alcoholic fatty liver disease*, NAFLD dans la terminologie anglo-saxonne) regroupant stéatose et stéatohépatite métabolique (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) est en train de devenir un enjeu de santé publique mondial due à son incidence croissante, en grande partie expliquée par l'augmentation de la prévalence du diabète et de l'obésité.

La connaissance de l'histoire naturelle de la NAFLD comporte encore de nombreuses incertitudes. Les mécanismes physiopathologiques responsables de la progression d'une stéatose isolée, considérée comme bénigne et non évolutive, à une NASH, considéré comme la forme plus agressive de la maladie, sont mal connus (Kleiner and Brunt) (Chalasani, Younossi et al. 2012).

La stéatose hépatique qui correspond à l'accumulation d'acides gras libres (AGL) sous forme des triglycérides dans les hépatocytes est considérée comme une lésion bénigne et non-progressive, ne justifiant aucune prise en charge spécifique. La stéatose hépatique n'augmente pas la mortalité globale ou hépatique (Dam-Larsen, Franzmann et al. 2004; Ekstedt, Franzen et al. 2006; Dam-Larsen, Becker et al. 2009). En revanche, la mortalité hépatique est multipliée par dix chez les patients atteints de NASH essentiellement en raison des complications de la cirrhose et du cancer du foie (Ascha, Hanouneh et al.; Starley, Calcagno et al.; Adams, Lymp et al. 2005; Ekstedt, Franzen et al. 2006; Soderberg, Stal et al. 2010). Il est résulte donc que le pronostic de la stéatose isolée et celui de la stéatohépatite sont très différents.

Les données obtenues dans les modèles animaux laissent penser que l'accumulation isolée de triglycérides dans le foie serait plutôt un mécanisme protecteur de la lipotoxicité et donc de la survenue des lésions de NASH (Listenberger, Han et al. 2003). En effet, l'inhibition de l'étape finale de la synthèse des triglycérides est associée à une diminution de stéatose et à une majoration des lésions nécrotico-inflammatoires de stress oxydant et de fibrose. Ces résultats suggèrent que les lésions de NASH pourraient être en rapport avec un afflux d'AGL dépassant

les capacités d'estérification en triglycérides des hépatocytes et aboutissant à l'accumulation d'espèces lipotoxiques, favorisant ainsi le stress oxydant et les lésions nécrotico-inflammatoires (Yamaguchi, Yang et al. 2007).

Le modèle actuel expliquant l'histoire naturelle de la NAFLD s'appuie sur ces données expérimentales. On estime que les patients ayant une stéatose isolée, soit une forme bénigne de stockage des graisses intrahépatiques sont protégés de la progression de maladie hépatique. Dans ce cas, il devrait y avoir peu ou pas de passage de la stéatose isolée à la stéatohépatite, ou au moins pas plus que ce qui est attendu compte-tenu de la variabilité d'échantillonnage de la biopsie hépatique.

Nous avons réalisé une étude chez 70 patients atteints de la NAFLD avec des biopsies hépatiques de suivi (intervalle moyenne 3,4 ans) afin de mieux comprendre l'évolution histologique de cette maladie, en particulier par rapport au diagnostic initial de la stéatose hépatique ou la stéatohépatite. Nous avons également cherché à corréler les changements histologiques à l'évolution des comorbidités métaboliques souvent associés à la NAFLD.

Research Article

EASL EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER | JOURNAL OF HEPATOLOGY

A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver

Raluca Pais, Fréderic Charlotte, Larissa Fedchuk, Pierre Bedossa, Pascal Lebray, Thierry Poynard, Vlad Ratziu*, for the LIDO Study Group

Université Pierre et Marie Curie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France

See Focus, pages 403–404

Background & Aims: Disease progression in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is not well understood and there is controversy about whether non-alcoholic fatty liver (NAFL, i.e., steatosis alone or with mild inflammation not qualifying for steatohepatitis) can evolve towards steatohepatitis (NASH) with fibrosis.

Methods: We reviewed 70 patients with untreated NAFLD and with two biopsies performed more than one year apart. Clinical and biological data were recorded at the time of both biopsies. Alcohol consumption did not change during follow-up.

Results: Initially 25 patients had NAFL and 45 had NASH and/or advanced fibrosis. After a mean follow-up of 3.7 years (s.d. 2.1), 16 NAFL patients developed NASH, eight with severe ballooning and six with bridging fibrosis on the follow-up biopsy. Patients with mild lobular inflammation or any degree of fibrosis were at higher risk of progression than those with steatosis alone. Those with unambiguous disease progression were older and had worsening of their metabolic risk factors (higher weight and more diabetes at baseline and during follow-up). In the whole cohort, ballooning progression and bridging fibrosis often occurred together and co-existed with a reduction in ALT, higher weight gain, and a higher incidence of diabetes during follow-up.

Conclusions: A substantial proportion of patients with NAFL can progress towards well-defined NASH with bridging fibrosis, especially if metabolic risk factors deteriorate. Even mild inflammation or fibrosis could substantially increase the risk of progression when compared to steatosis alone. Current monitoring practices of these patients should be revised.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Steatosis; Steatohepatitis; Fibrosis; Insulin resistance; Liver biopsy.
Received 11 July 2012; received in revised form 2 April 2013; accepted 25 April 2013; available online 9 May 2013
* DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.002.
Members of the LIDO (Liver Injury in Diabetes and Obesity) Study Group are listed in the Acknowledgments section.
* Corresponding author. Address: Université Pierre et Marie Curie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France.
E-mail address: vlad.ratziu@upmc.fr (V. Ratziu).
Abbreviations: NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gammaglutamyltranspaptidase; NAS, NAFLD activity score; HOMA-IR, homeostasis model assessment.

Introduction

Patients with NAFLD are increasingly seen in hepatology clinics, and their management requires decisions on invasive exploration, follow-up, and treatment. These decisions are based on our understanding of the natural history of this disease, which has so far been largely incomplete. One reason is the inter-individual variability in the natural course of the disease, a feature shared by many other chronic liver diseases. Another reason is the significant heterogeneity of the clinical presentation. Indeed, NAFLD encompasses both steatohepatitis (NASH), considered the more aggressive form of the disease, and NAFL (non-alcoholic fatty liver) grouping isolated steatosis and steatosis with mild lobular inflammation alone [1,2]. NAFL is thought of as a benign, non-progressive condition which does not increase overall or liver-related mortality [3–5]. In contrast, patients with NASH have a ten-fold increase in liver-related mortality, die of cirrhosis, and develop liver cancer [3,6–9].

Because of this clear-cut dichotomy, NAFL and NASH appear to be very distinct entities, somehow diverging in the early course of the disease. This paradigm was corroborated by experimental data suggesting that in animal models, triglyceride storage protects liver cells from fatty acid-induced apoptotic pathways [10]; moreover, blocking the final step of triglyceride synthesis by genetic inactivation of diacylglycerol acyltransferase type 2 results in less steatosis, but more inflammation, oxidative stress, and fibrosis [11]. Therefore, the current thinking is that triglycerides are a form of safe storage of liver fat and therefore patients with steatosis alone are protected from hepatic deterioration. In this case, there should be little or no transition from steatosis to steatohepatitis, or at least no more than expected from the background noise due to sampling variability of the liver biopsy.

We undertook a study of NAFLD patients with repeat liver biopsies in order to better understand the histological course of

the disease, specifically in relation to the initial findings of NAFL or steatohepatitis. We also aimed at correlating histological changes to changes in the metabolic co-morbidities often associated with NAFLD. Only patients that were unable to successfully implement lifestyle modifications and thus had persistent NAFLD were included.

Patients and methods

We retrospectively analyzed our histology database between 1998 and 2009 and identified all adult patients diagnosed with primary NAFLD (defined as steatosis ⩾10%) who had undergone a repeat liver biopsy one year or more after the index biopsy. Patients with liver diseases other than NAFLD (drug-induced hepatotoxicity, chronic hepatitis B or C, genetic hemochromatosis, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, α1-antitrypsin deficiency, Wilson's disease, etc.) were excluded. No patient had daily alcohol consumption higher than 30 g (men) and 20 g (women). Patients exposed to drugs that can induce secondary NASH (corticosteroids, amiodarone, tamoxifen) were not included. Patients included in therapeutic trials with follow-up liver biopsy were included if they were administered placebo. No specific dietary interventions or physical activity programs were implemented in these patients.

The main reasons for the follow-up liver biopsy were: persistent ALT elevation along with persistence/aggravation of metabolic risk factors; requirement for inclusion in clinical trials (rosiglitazone, high dose ursodeoxycholic acid, selective anticaspase inhibitors, antiPDE4 inhibitors) and the inability to successfully implement dietary and lifestyle changes. Patients who significantly lost weight during follow-up did not undergo a control liver biopsy.

The following clinical and laboratory data were observed at the time of the index and follow-up biopsy: age, past medical history (hypertension, diabetes, dyslipidemia, coronary artery disease, past medical treatment), daily alcohol consumption, tobacco use, body mass index (BMI), waist circumference, and blood pressure. Laboratory tests included: platelet count, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gammaglutamyltranspeptidase (GGT), fasting glucose and insulin, and lipid profile (cholesterol and tryglicerides). Insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment (HOMA-IR, fasting insulin (mUI/L) × fasting glucose (mmol/L)/22.5).

Histological assessment

Liver biopsy was performed percutaneously under ultrasound guidance. For the purpose of this study, all liver biopsies were reviewed in random order by a single pathologist who was unaware of the patient's identity, clinical and biological data, and sequential order of the biopsies. Biopsies were scored using the scoring system proposed by Kleiner *et al.* [12] including the NAFLD activity score (NAS) and fibrosis staging. Patients were classified as having steatohepatitis (i.e., NASH, defined as steatosis (>5%) co-existing with hepatocellular ballooning and lobular necroinflammation, with or without fibrosis) or as having NAFL. The latter was defined as either steatosis alone (bland steatosis) or steatosis without evidence of ballooning, with spotty lobular inflammation of grade 1 maximum (<2 foci/sox power field) and no fibrosis or fibrosis limited to mild periportal or perisinusoidal fibrosis (stage 1 or 2) [1]. Hence, patients with NAFL had insufficient histological injury to qualify for steatohepatitis [1].

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means (±SD) or medians [IQR], as appropriate and categorical variables as frequency and percentage. Numerical variables were compared using analysis of variance for those that were normally distributed and non-parametric tests, such as the Mann-Whitney *U* test, for those without a normal distribution. Differences between categorical variables were analyzed using the Fisher's exact test. Two-sided *p*-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical tests were performed using the NCSS 2007 software (Jerry Hintze, Kaysville, UT).

Results

Study population and overall changes between biopsies

Of the 109 patients fulfilling the inclusion criteria, 32 had been treated with an active drug in a randomized controlled trial and 7 had incomplete clinical or biological data. Therefore, 70 patients were analyzed (Table 1 and Fig. 1). Nine patients had isolated, bland steatosis (without any ballooning or lobular inflammation), and 16 patients had steatosis and minimal lobular inflammation, without ballooning or advanced fibrosis. Thus 25 patients had insufficient criteria for NASH and belonged to the NAFL category. Six patients had steatosis without ballooning but with lobular inflammation and advanced fibrosis (bridging fibrosis in 4 and cirrhosis in 2); because advanced fibrosis was present, we conservatively considered that these patients in fact had NASH with missed ballooning lesions due to sampling variability of the biopsy. The 39 remaining patients fulfilled typical histological criteria for NASH (Fig. 1). Fifteen of them had bridging fibrosis and one had cirrhosis.

The mean time interval between biopsies was 3.4 years (s.d. 2.2, range 1–12 years); in 20 patients (29%), the biopsies were taken more than 5 years apart. Alcohol consumption did not change between the two biopsies except for a female patient that reduced alcohol intake by 5 g/d and a male patient that increased it by 20 g, thus reaching the 30 g/d limit. Mean BMI increased by 0.34 (s.d. 2) kg/m^2 (a mean increase of 1.32 kg). Three patients developed diabetes and three were diagnosed with arterial hypertension during follow-up. Thus most patients were stable or experienced only a slight progression in exposure to metabolic risk factors.

Histologically, steatosis progressed by ⩾1 grade in 13 patients (19%) and regressed by ⩾1 grade in 23 patients (33%, $p = 0.08$). Ballooning progressed by ⩾1 grade in 26 patients (37%) and regressed by the same amount in 11 patients (16%, $p < 0.01$). Fibrosis progressed by ⩾1 stage in 20 patients (29%) and regressed by ⩾1 stage in 20 additional patients. Finally, the NAS score increased by ⩾1 point in 29 patients (41%) and decreased by ⩾1 point in 22 patients (31%, $p = 0.29$) (Fig. 2).

Histological course of NAFL

Twenty-five patients had NAFL on the index biopsy. Ten of them had no fibrosis at all; 15 had minimal portal or perisinusoidal fibrosis. When compared to the other 45 patients with NASH, patients with NAFL had a lower waist circumference (mean 99 cm *vs.* 104 cm, $p = 0.05$), lower HOMA scores [3.27 (s.d. 1.67) *vs.* 5.77 (s.d. 4.37), $p = 0.03$] and a trend towards less frequent diabetes (26% *vs.* 39%) and arterial hypertension (44% *vs.* 58%). There was no difference in age, sex, BMI, daily alcohol or tobacco consumption, aminotransferase and gamma GT, cholesterol or triglyceride values. The median length of biopsy was 20 mm for both groups. The amount of steatosis (median of 40%) was not different between the two populations.

The histological course of these patients with NAFL is depicted in Fig. 3. After a mean follow-up of 3.7 years (s.d. 2.1), hepatocyte ballooning occurred in 16 of the 25 patients, including 8 who progressed from none to marked ballooning (grades 0 to 2). Therefore, at least these 8 patients (32% of those with NAFL) clearly progressed to NASH during follow-up. Importantly, bridging fibrosis developed in six patients (five of whom displayed ballooning on the follow-up biopsy). Of these 6 patients, one had no fibrosis initially and 5 had only portal or perisinusoidal fibrosis.

We then thought to determine the histological determinants of disease progression. Table 2 shows individual histological data from the 25 NAFL patients and findings on follow-up liver biopsy

Table 1. Study group baseline characteristics (N = 70).

	Mean, %	Median [IQR]
Age (years)	52 ± 10.5	52 (43-58)
Body mass index (kg/m²)	29 ± 3.63	29 (26-32)
Diabetes mellitus, n (%)	24 (35)	
Hypertension, n (%)	36 (52)	
Fasting glucose (mmol/L)	6.5 ± 2.42	5.6 (5-7)
Insuline (μmol/L)	15.82 ± 10.5	14.5 (8.4-19.4)
HOMA-IR (%)	4.86 ± 3.75	3.56 (2.17-6)
Total cholesterol (mmol/L)	5.50 ± 1.2	5 (4.58-5)
Triglycerides (mmol/L)	2.07 ± 1.88	1.6 (1-2.2)
ALT (IU/L)	85 ± 43	79 (51-108)
Alcohol (g/d)	4.4 ± 7.5	0 (0-10)
Tobacco, n (%)	11 (16)	
Length of liver biopsy, mm/ portal spaces (n)	23.4 ± 10.9/ 20 ± 12.3	20/16
Steatosis grade, 0/1/2/3, (%)	0/37/29/34	
Lobular inflammation, 0/1/2, (%)	24/62/14	
Ballooning, 0/1/2 (%)	44/36/20	
Mean NAS score (SD) <3/3-4/>4, (%)	3.6 (1.4) 22/48/24	3 (3-5)
Fibrosis stage, 0/1/2/3/4, (%)	24/26/19/27/4	

IQR, interquartile range.

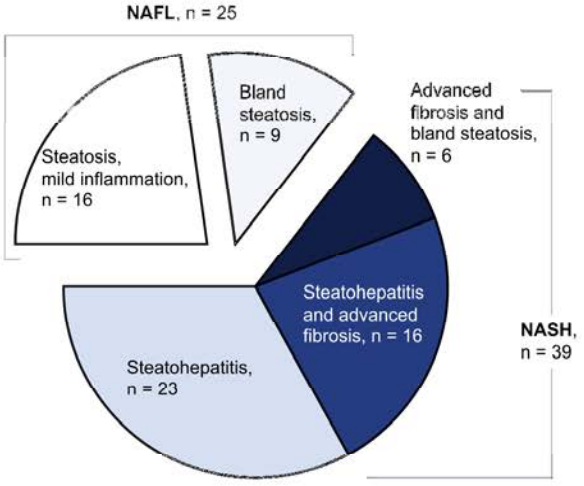


Fig. 1. Baseline histological characteristics. 25 patients had NAFL; 6 patients had steatosis without ballooning, but with bridging fibrosis or cirrhosis; 39 patients fulfilled histological criteria of NASH.

with regard to progression to steatohepatitis and bridging fibrosis. Of the 5 patients with steatosis alone (without inflammation, liver cell injury or fibrosis in any location) four did not experience disease progression after a follow-up of at least 5 years (Fig. 4). Conversely, of the 16 patients with lobular inflammation, all but three experienced some form of disease progression (Fig. 4). The same was true for seven of the nine patients displaying portal inflammation. Of the 15 patients with minimal fibrosis (either perisinusoidal or portal), 13 experienced some form of disease progression; conversely, 6 out of the 10 without

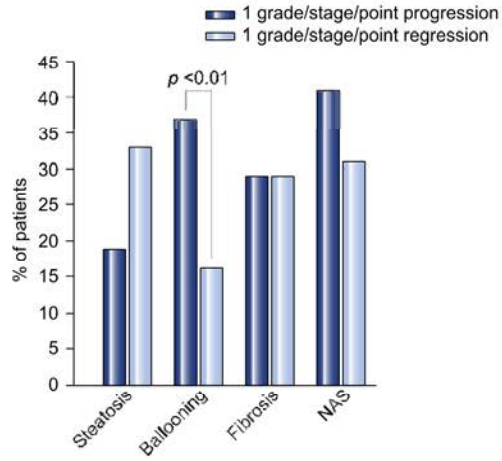


Fig. 2. Overall histological changes. Steatosis progressed in 20% of patients and regressed in 33% ($p = 0.08$); ballooning progressed in 37% of patients and regressed in 16% ($p < 0.01$); fibrosis regressed and progressed by 1 stage in 29% of patients; the NAS score increased or decreased by one point or more in 41% respectively 31% of patients.

any fibrosis did not progress. Finally, among the 17 patients with inflammation (portal or lobular), only 3 did not experience disease progression (Fig. 4). Collectively, these data suggest that NAFL patients with some form of inflammation or fibrosis are at risk of disease progression whereas this risk is much lower in patients displaying only steatosis.

The mean time between biopsies was not different between these 8 patients with clear progression to NASH and the 17 other patients. The median age was 58 *vs.* 46 years ($p = 0.04$), and there was a trend towards a higher BMI (median 30.1 *vs.* 26.2 kg/m²) and more diabetes (38% *vs.* 18%) at baseline in the group of progressing patients. The metabolic risk factors did not significantly change between biopsies in the latter group. However, there was a trend towards a higher weight gain (median 1.5 kg *vs.* 1 kg) and more frequent diabetes at follow-up (50% *vs.* 18%) than in patients without progression. Disease progression occurred despite a trend in ALT reduction (median baseline at 78 IU/L *vs.* 56 IU/L at follow-up, $p = 0.2$).

The initial and follow-up biopsies from the 25 patients with NAFL underwent another reading by a different pathologist. Only 2 patients out of 25 were not confirmed as having NAFL. Occurrence of ballooning was confirmed in 13 of the 16 patients. Progression to grade 2 ballooning was confirmed in 4 of the 8 patients and progression to bridging fibrosis in 5 of the 6 patients. Thus, qualitatively, the results were largely confirmatory, while numerical differences reflect expected inter-observer variability.

Significant disease changes

Occurrence of ballooning

During follow-up, ballooning occurred in 21 patients (30%) and resolved in 6 (9%, $p < 0.01$, Fig. 5). In most patients, ballooning occurred without notable weight gain and despite a ⩾25% reduction in ALT (14 patients) and a regression of steatosis (⩾1 grade in all but 4 patients). Interestingly, progression of ballooning often coincided with progression of fibrosis (7/21 patients progressed by ⩾1 stage, including 4 by two stages).

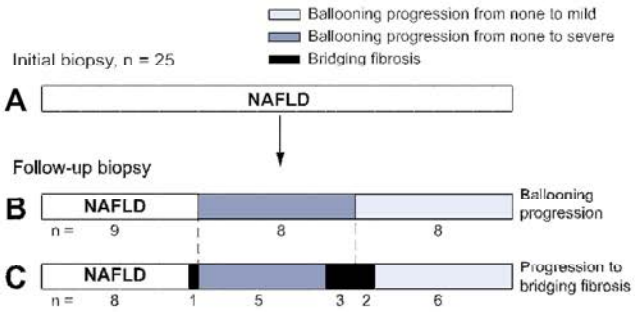


Fig. 3. Histological course of NAFL, individual data. Initial biopsy: (A) 25 patients had NAFLD. Follow-up biopsy: (B) 16 patients had ballooning progression: 8 from none to mild and 8 from none to severe; (C) 6 patients developed bridging fibrosis (black boxes).

The mean interval between biopsies was not different in patients that developed ballooning and those that cleared it. The same holds true for baseline age, sex, BMI, type 2 diabetes, arterial hypertension, daily alcohol or tobacco use and the amount of steatosis at the initial biopsy.

Occurrence of bridging fibrosis

During follow-up, bridging fibrosis occurred in 11 patients (16%) and cleared in only 6 cases (9%) (Fig. 5). In patients with bridging fibrosis, six had no or minimal (stage 1) fibrosis at baseline. Again, bridging fibrosis developed together with ballooning progression: at baseline, ballooning was absent/mild in 9 patients and severe in 2; at follow-up, it was absent/mild in 4 and severe in 7. There were no significant changes in steatosis or lobular inflammation between baseline and follow-up. Progression to bridging fibrosis occurred despite a reduction in aminotransferase values in 7 of the 11 patients.

The mean interval between biopsies was not different between progressors, regressors or patients with no significant changes (3.72, 3.26, and 3.38 years, respectively); age, sex, BMI, and alcohol consumption at baseline were similar. Diabetes was present in 60% of patients with progression to bridging fibrosis *vs.* 30% of those without ($p = 0.06$). Those patients who progressed had a trend toward more weight gain (≥2 kg weight gain in 55% *vs.* 36%) and a higher BMI at follow-up (median 32.1) *vs.* the others (median 28.5), but the differences were not statistically significant.

Changes in NAS

Eleven patients progressed from a NAS score of 4 or less to a score of 5 or more, including 6 that started at ≤3. Conversely, only 7 patients regressed from a NAS score of ≥5 to less than 5, including 3 from ≥5 to ≤3 (Fig. 5). In most cases, progression was due to an increase in the ballooning or necroinflammation score and not to changes in the steatosis score. Progression occurred

Table 2. Individual histologic data (index and follow-up) from the 25 patients with initial NAFL.

Patient	Initial biopsy					Follow-up biopsy		Time between biopsies (yr)
	% steatosis	Lobular inflammation	Portal inflammation	Perisinusoidal fibrosis	Portal fibrosis	Steatohepatitis (ballooning grade)	Bridging fibrosis	
1	70	1	1	0	1	Yes (2)	Yes	4.6
2	30	1	1	0	1	Yes (1)	Yes	2.9
3	70	1	0	0	1	Yes (1)	Yes	5.9
4	60	0	0	0	1	Yes (2)	Yes	5.9
5	70	0	0	1	1	Yes (2)	Yes	4.2
6	60	0	0	0	0	No	Yes	5.6
7	70	1	1	0	0	Yes (2)	No	2.1
8	60	1	1	0	0	Yes (1)	No	4.5
9	60	1	1	0	1	Yes (1)	No	2.3
10	40	1	1	1	1	Yes (2)	No	6.7
11	80	1	0	1	0	Yes (1)	No	1.4
12	70	1	0	1	0	Yes (2)	No	4.9
13	70	0	1	0	0	Yes (1)	No	10
14	40	1	0	1	1	Yes (1)	No	3.4
15	40	1	0	0	1	Yes (2)	No	1.6
16	30	1	0	1	1	Yes (2)	No	1
17	20	1	0	0	1	Yes (1)	No	5.1
18	30	1	1	0	0	No	No	1.7
19	20	1	1	0	0	No	No	3.9
20	70	1	0	1	1	No	No	1
21	40	0	0	1	0	No	No	1.1
22	40	0	0	0	0	No	No	5.1
23	30	0	0	0	0	No	No	6.7
24	30	0	0	0	0	No	No	5.9
25	10	0	0	0	0	No	No	5.2

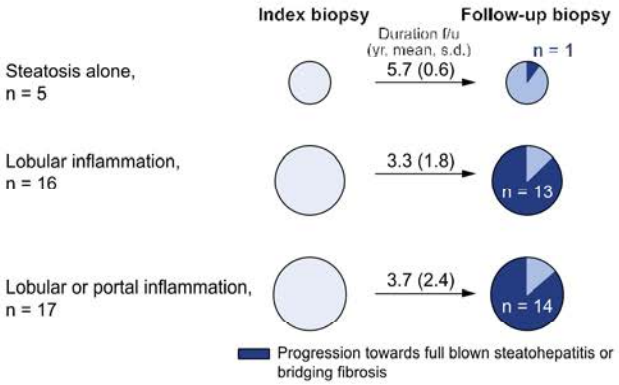


Fig. 4. Disease progression in patients with NAFLD according to the presence of hepatic inflammation on index biopsy. The size of circles is proportional to the number of patients; the dark blue quarters denote patients experiencing histological progression towards full blown steatohepatitis or bridging fibrosis.

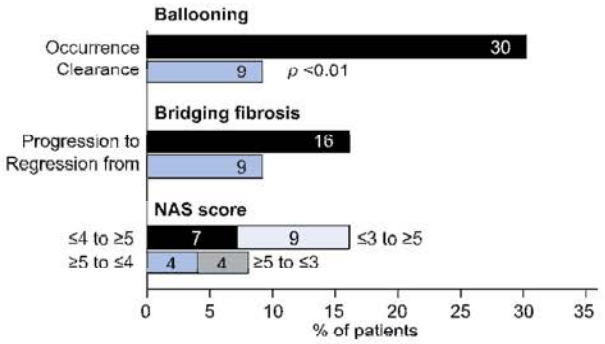


Fig. 5. Significant changes for ballooning (occurrence from none to present; clearance from present to absent) and bridging fibrosis (progression from mild/none to bridging; regression from bridging to mild/none). Changes in NAS. Increase from ⩽4 to ⩾5 (n = 16, including 9 having progressed from ⩽3); reduction from ⩾5 to ⩽4 (n = 8, including 4 with a reduction to ⩽3). Numbers in boxes represent percentages.

despite a trend towards ALT reduction in 8/11 patients (73%), from 86 IU/L (s.d. 41) to 67 IU/L (s.d. 23), $p = 0.09$. There were no significant differences in length of follow-up, baseline age, sex, BMI, hypertension, diabetes, alcohol or tobacco use, ALT, GGT, glucose or lipid profile in those patients who progressed *vs.* the others.

Seven patients experienced a reduction in NAS which was mostly due to a decrease in ballooning and necroinflammation. These patients were not different from the 63 other patients for baseline or follow-up characteristics. However, they had a lower baseline BMI (mean, 27.7 *vs.* 29.1, $p = 0.33$) and a median weight loss of 2 kg during follow-up *vs.* a median weight gain of 1 kg in 63 other patients. One patient progressed to cirrhosis despite NAS reduction over a 5.8-year interval. He developed diabetes and severe arterial hypertension during follow-up. On initial biopsy, this patient had mild ballooning and inflammation, grade 3 steatosis, and bridging fibrosis. Interestingly, there was no correlation between changes in NAS and changes in fibrosis ($r = 0.09$, $p = 0.46$).

Factors associated with disease progression

Twenty-five patients (36%) had disease progression defined by a composite index which required either progression from NAFL to NASH, occurrence of bridging fibrosis or at least ⩾1 point increase in the NAS score from ⩽4 to ⩾5. These patients were not different from the others as far as clinical, biological, and metabolic characteristics, but had a significantly higher amount of steatosis (median 60% *vs.* 40%, $p = 0.008$). Metabolic risk factors did not significantly change during follow-up, but there was a trend towards a higher baseline HOMA IR (5.8 ± 5.1 s.d. *vs.* 3.9 ± 2.5 s.d., $p = 0.09$) in progressors. Disease progression occurred despite ⩾25% ALT reduction. In univariate analysis, only the amount of steatosis on initial biopsy correlated with disease progression ($r = 0.325$, $p = 0.005$). In multivariate analysis, the amount of steatosis was the only independent factor associated with disease progression, even after adjustment for age, sex, BMI, and aminotransferase levels ($r = 0.318$, $p = 0.01$).

Discussion

These findings challenge the current dogma that NAFL is a non-progressive condition that rarely, if ever, results in NASH or advanced fibrosis. The dichotomy between NASH, a potentially progressive condition, and NAFL (i.e., steatosis alone or with mild inflammation) that is not associated with adverse hepatic outcomes, has until now been the basis of our understanding of the natural history of NAFLD. Early studies on a small number of patients with repeat liver biopsies failed to show any significant changes in patients with steatosis alone [13]. Later reports showed that patients with bland steatosis or steatosis and non-specific inflammation have the same survival as the age- and sex-matched general population [14], while patients with steatohepatitis have increased liver-related mortality [15]. The benignity of the long-term outcome of non-alcoholic steatosis [4] was further reinforced by the findings that only one patient out of a series of 170 NAFLD patients with pure fatty liver died of cirrhosis [5]. In striking contrast, steatohepatitis, instead of steatosis, significantly increased liver-related mortality ten-fold [3,6]. Moreover, when analyzing ten pathological series with follow-up liver biopsy, Argo *et al.* concluded that among histological lesions at the index biopsy, necroinflammation is the only predictor of fibrosis progression, further reinforcing the view that disease progression is dependent on the presence of necroinflammatory lesions which are part of the definition of steatohepatitis.

In this report, which is one of the largest monocentric series of carefully defined patients with NAFL, we show that disease progression towards unambiguous steatohepatitis (severe ballooning) and bridging fibrosis is possible after a rather short follow-up of less than 5 years. Although sampling error is a possible confounder (i.e., lobular inflammation and ballooning missed on the initial biopsy), we believe it does not explain the bulk of our findings; first, because patients with NAFL had a different profile than those with histologically defined steatohepatitis. They were less insulin resistant as measured by surrogate markers and related clinical phenotypes, thus confirming observations made by others a decade ago [16]. Second, because together with the occurrence of steatohepatitis, fibrosis also progressed in some of them from none or very low levels to bridging fibrosis. Since we describe patients evolving from no ballooning to severe bal-

looning and from no or mild fibrosis to bridging fibrosis, we believe that these data robustly show genuine disease progression and not simply slight changes in histological grades/stages. On a smaller scale, Wong *et al.* [17] reported on three patients out of a series of 13 with mild NAFLD that progressed towards NASH, meaning lobular inflammation and ballooning of any degree, i.e., a lower stringency definition than the one used here, and therefore more prone to sampling variability or inter-observer variability. They also report on the case of one individual progressing from a NAS score of <3 to 5 during follow-up [17]. However, the NAS is not designed to ascertain the presence of NASH, and the composite score could partly reflect changes in steatosis. Therefore, we believe the present report is the best available demonstration so far of unambiguous disease progression in patients with NAFL.

The number of patients presented here is still limited, and these findings require confirmation in larger series. However, a striking finding is that patients with pure (bland) steatosis without any inflammation or fibrosis seem to be at lowest risk of disease progression. On the other hand, even mild lobular or portal inflammation or fibrosis in any location substantially increases the risk of subsequent diagnosis of steatohepatitis or advanced fibrosis. Thus, in patients with NAFLD, mild lobular inflammation or early perisinusoidal or periportal fibrosis is not trivial but rather indicates a risk of disease progression, particularly if metabolic co-morbidities, including overweight, deteriorate. Hence, careful rather than loose monitoring of these patients is advisable and these patients cannot receive definitive reassurance that their hepatic prognosis is benign. These findings are in agreement with the key observation made by Argo *et al.* that necroinflammation increases the risk of fibrosis progression in patients with NASH and hence is an important driver of disease progression. Collectively, these data advance our understanding of the natural history of NAFLD by identifying different risk profiles within NAFL patients, the less severe end-of-spectrum of NAFLD.

While there is still uncertainty about the factors promoting the transition from NAFL to NASH, converging evidence from this series suggests that patients with clear disease progression were older and had worsening of metabolic risk factors (higher BMI, more weight gain, more diabetes) during follow-up compared to those without progression. Large cohort studies have confirmed that the occurrence of steatosis, defined by imaging, was associated with enhancement of metabolic co-morbidities associated with insulin resistance [18]; conversely, the resolution of steatosis coincided with their regression, quantitatively or qualitatively. Based on current and previous findings, we hypothesize that in some patients with NAFL, the persistence or worsening of insulin resistance and related metabolic risk factors (overweight, diabetes, hypertension, dyslipidemia, etc.) will trigger the occurrence of steatohepatitis. Future studies should aim at better identifying, among the large number of patients with non-alcoholic steatosis, those at risk of disease progression. The present findings stress the need to revise current guidelines that do not recommend specific hepatic monitoring in NAFLD patients without NASH [2,19]. Careful hepatic monitoring including insulin resistance surrogates, non-invasive fibrosis markers, and potentially a repeat liver biopsy might be necessary in selected patients.

In this series of 70 NAFLD patients with both NAFL and NASH, the overall trend between biopsies was a reduction in steatosis, an increase in the amount of hepatocyte cell injury (ballooning) and, in some patients, progression towards advanced fibrosis. Despite a rather short time interval between biopsies, a proportion of NAFLD patients clearly experience disease progression. Alcohol consumption was nil or very low in this series and did not increase during follow-up. In this selected NAFLD population, drinking alcohol did not explain the histological deterioration.

Interestingly, bridging fibrosis developed together with an increase in hepatocyte ballooning, a feature of hepatic cell injury. This further indicates that steatohepatitis may be a major driving force behind fibrosis progression as suggested by other reports based on serial liver biopsies [20]. Therefore, a reasonable inference is that clearance of steatohepatitis might represent a valid therapeutic end point, as currently recommended by expert panels [19,21].

Of note, in some patients disease progression occurred despite a reduction in ALT levels; while only two ALT measurements were available here, previous reports showed fibrosis progression despite a similar reduction in ALT [17,22]. A spontaneous decline in ALT levels during follow-up, especially if the metabolic risk factors are still present (i.e., not concomitant with significant weight reduction), should not falsely reassure patients and health care providers. Finally, as shown in the course of patients with NAFL, there was a trend towards a higher proportion of diabetes and an increase in BMI at follow-up in patients with histological deterioration, further strengthening the assertion that underlying metabolic abnormalities increase the risk of progressive disease. Conversely, patients with NAS reduction improved their metabolic profile.

There are limitations to the design of the present study. This is a retrospective series and not a prospectively designed cohort with systematic control biopsies at fixed time intervals. Therefore, the rate of progression and impact of correlative co-morbidities in the course of the disease should be interpreted with caution. All patients were explored in a tertiary referral center with academic interest in this disease, which, arguably, could induce a bias towards more severe cases. Nonetheless, the decision to perform a control liver biopsy was not determined by specifics of the population or findings on the initial biopsy. In fact, in many cases, the biopsy was repeated regardless of the initial severity in order to have a recent histological evaluation for inclusion in therapeutic trials. The population reported here covers the whole spectrum of NAFLD. Moreover, in our institution only patients who significantly lost weight and normalized ALT with diet and lifestyle interventions are not considered for histological evaluation. We therefore believe that, despite the absence of a predefined protocol for repeating the liver biopsy, this population is representative, to a large extent, of all NAFLD patients seen in tertiary centers. Moreover, the persistence of overweight and other metabolic risk factors and the absence of significant changes in alcohol consumption during follow-up are also typical of the population at large of subjects with NAFLD, so histological changes captured in this cohort are most probably close to those dictated by the natural course of the disease.

In conclusion, this large series of patients with histological follow-up shows that a fraction of patients with NAFL can unambiguously evolve towards well-defined steatohepatitis, and in some of them, bridging fibrosis. Patients with NAFL might not be a homogenous population. The presence of mild lobular inflammation or any amount of fibrosis substantially increases the risk of histological progression in the mid-term while those with steatosis alone are at lowest risk. Consequently, and pending confirma-

tion by future reports, current practices of no or very relaxed hepatic monitoring in patients with steatosis alone might not be appropriate, and a more active, hepatological follow-up could be necessary. Patients with disease progression experienced a degradation of clinical features associated with insulin resistance. The potential for histological deterioration in NAFLD patients who do not drink alcohol is not negligible, even after a short follow-up.

Financial support

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° HEALTH-F2-2009-241762 for the project FLIP.

Conflict of interest

VR is a consultant for Abbot, Conatus, Galmed, Genfit, Gilead, Enterome, and Phenex all unrelated to the present manuscript.

Acknowledgments

Members of the LIDO Study Group are: André Grimaldi, Philippe Giral, Eric Bruckert, Arnaud Basdevant, Karine Clement, Agnès Hartemann-Heurtier, Fabrizio Andreelli, Sophie Gombert, Sophie Jacqueminet, Dominique Simon, Joseph Moussalli, Pascal Lebray, Dominique Bonnefont-Rousselot, Yves Benhamou, Cecilia D'Arrondel, Carole Bernhardt, Isabelle Ravalet, Hôpital Pitié-Salpêtrière; Philippe Podevin, Hôpital de Provins; Christian Boitard, Etienne Larger, Agnès Sola Hôpital Hotel-Dieu; Lawrence Serfaty, Chantal Housset, Jacqueline Capeau, Hôpital Saint Antoine all in Paris, France.
We wish to thank Dr. Curtis Argo for notable suggestions that improved the quality of the manuscript.

References

[1] Kleiner D, Brunt E. Non-alcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. Semin Liver Dis 2012;32:003–013.
[2] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. Hepatology 2012;55:2005–2023.
[3] Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology 2006;44:865–873.
[4] Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sorensen TI, et al. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. Gut 2004;53:750–755.
[5] Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann M-B, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. Scand J Gastroenterol 2009;44:1236–1243.
[6] Soderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. Hepatology 2010;51:595–602.
[7] Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. Gastroenterology 2005;129:113–121.
[8] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. Hepatology 2010;51:1820–1832.
[9] Ascha MS, Hanouneh IA, Lopez R, Tamimi TA-R, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology 2010;51:1972–1978.
[10] Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese Jr RV, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3077–3082.
[11] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology 2007;45:1366–1374.
[12] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005;41:1313–1321.
[13] Teli MR, James OFW, Burt D, Bennett MK, Day CP. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study. Hepatology 1995;22:1714–1719.
[14] Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology 1999;116:1413–1419.
[15] Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, Makhlouf H, Younoszai Z, Agrawal R, et al. Pathologic criteria for non-alcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. Hepatology 2011;53:1874–1882.
[16] Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Non-alcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology 2003;37:917–923.
[17] Wong VWS, Wong GLH, Choi PCL, Chan AWH, Li MKP, Chan HY, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. Gut 2010;59:969–974.
[18] Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of non-alcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med 2005;143:722–728.
[19] Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day CP, Marchesini G. A position paper on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 Special Conference. J Hepatol 2010;53:372–384.
[20] Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2009;51:371–379.
[21] Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for non-alcoholic steatohepatitis. Hepatology 2011;54:344–353.
[22] Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. Hepatology 2004;40:820–826.

V-2. Discussion de l'article 1.

La progression de la maladie est le plus souvent lente, et seule une minorité de patients est exposée au risque de cirrhose et de CHC. Toutefois, en raison de sa forte prévalence dans la population générale, la NAFLD pourrait devenir la première cause de cirrhose et de CHC.

Actuellement le modèle explicatif de l'histoire naturelle de la NAFLD repose sur une dichotomie entre la NASH, considérée comme la condition potentiellement progressive, et la stéatose hépatique (stéatose isolée ou avec inflammation minime) qui n'est pas associé aux complications hépatiques. Les résultats de cette étude remettent en question la notion actuelle d'évolution bénigne et donc d'absence de progression histologique de la stéatose hépatique isolée.

Selon les données de littérature, la première étude de suivi à long terme réalisée par Teli et al. chez un petit nombre de patients avec les biopsies hépatiques de suivi n'a pas retrouvé des changements histologiques significatifs chez les patients atteins de la stéatose isolée (Teli, James et al. 1995). D'autres études ont montré que les patients ayant une stéatose isolée ou une stéatose avec l'inflammation non spécifique ont la même survie que les témoins du même âge et de même sexe de population générale (Matteoni, Younossi et al. 1999), alors que les patients atteints de stéatohépatite ont la mortalité hépatique augmentée (Younossi, Stepanova et al.). L'évolution bénigne à long terme de la stéatose isolée (Dam-Larsen, Becker et al. 2009) a été aussi confirmée par les résultats d'une étude réalisée par Dam-Larsen et al. Les auteurs ont démontré que parmi 170 patients atteints de la stéatose hépatique, un seul est mort de cirrhose (Dam-Larsen, Becker et al. 2009). Par contre la mortalité hépatique était augmentée dix fois en cas de la stéatohépatite (Ekstedt, Franzen et al. 2006) (Soderberg, Stal et al. 2010).

Argo et al. ont réalisé un analyse de dix différentes études avec biopsies répétées et ont conclu que parmi les lésions histologiques, les lésions nécrotico-inflammatoires sont le seul élément prédictif de la progression de la fibrose, renforçant l'hypothèse que la progression de la maladie dépend de la présence de lésions nécrotico-inflammatoires qui font partie de la définition de la stéatohépatite (Argo, Northup et al. 2009).

Notre étude est une des plus grandes séries monocentriques réalisée chez les patients atteints de stéatose hépatique bien définie avec biopsie de suivi. La population étudiée couvre tout le spectre de la NAFLD. Nos résultats montrent que la progression de la maladie de la

stéatose isolée vers la stéatohépatite (confirmé par la présence de la ballonnisation sévère sur la biopsie) et la fibrose septale est possible dans une période de suivi de moins de 5 ans.

Une explication possible est l'erreur d'échantillonnage qui aurait pu, sur la première biopsie, manquer les lésions d'inflammation lobulaire ou de ballonnisation hépatocytaire, concluant ainsi à tort à l'absence de stéatohépatite. Plusieurs arguments sont en défaveur de cette explication.

Premièrement, les patients avec la stéatose hépatique isolée avaient un profil clinique et biologique différent de ceux ayant une stéatohépatite histologiquement prouvée. Les patients avec stéatose étaient moins insulinorésistants que ceux avec stéatohépatite ce qui confirme les données de la littérature (Marchesini, Bugianesi et al. 2003).

Deuxièmement, il existait, chez certains malades, de façon parallèle à l'apparition de la stéatohépatite, une progression vers la fibrose hépatique extensive dans certains cas. De même la progression de la stéatohépatite était franche avec passage, pour certaines lésions élémentaires du stade absent au stade marqué ou nombreux à la seconde biopsie, témoignant d'une réelle progression et non d'une variation d'un degré/grade.

Notre étude a des certaines limitations, parce qu'il s'agit d'une étude rétrospective et non d'une étude prospective avec un délai fixe de biopsie de contrôle. Pour cette raison, la vitesse de progression et l'impact des comorbidités corrélatives à la progression de la maladie doivent être interprétés avec prudence. Tous les patients observés sont suivis à l'hôpital dans le service spécialisé et la cohorte étudiée comprend de cas plus graves en induisant un biais de sélection.

Le nombre de patients inclus dans cette étude reste limité et nos résultats nécessitent une confirmation dans de plus grandes séries. En fait, l'une des constatations les plus surprenantes de cette étude est que les patients ayant une stéatose isolée sans inflammation ou fibrose semblent avoir un faible risque de progression de la maladie. D'autre part, même la présence d'inflammation portale ou lobulaire minime ou de la fibrose quelque soit sa localisation augmente considérablement le risque de progression vers la stéatohépatite ou la fibrose avancée. Il s'ensuit que chez les patients atteints de la NAFLD, l'inflammation lobulaire minime ou la fibrose périsinusoïdale ou périportale précoce ne sont pas insignifiantes, mais signifient plutôt un risque de progression de la maladie, en particulier si les comorbidités métaboliques, y compris

un surpoids, se détériorent. Par conséquent, un suivi régulier de ces patients est nécessaire et leur pronostic ne peut pas être considéré comme bénin.

On trouve la même conclusion dans une étude réalisée par Argo et al. (Argo, Northup et al. 2009) La présence des lésions nécrotico-inflammatoires est un facteur important de progression de la maladie, qui augmente le risque de progression de la fibrose chez les patients atteints de la NASH. Les données obtenues nous ont permis de mieux comprendre l'histoire naturelle de la NASH en identifiant des différents profils à risque parmi les patients avec une stéatose hépatique, la forme moins sévère de NAFLD.

Pour l'instant, les facteurs favorisant le passage de la stéatose isolée à stéatohépatite ne sont qu'incomplètement connus. Cette étude suggère que les patients qui progressaient étaient plus âgés et présentaient une aggravation des facteurs de risque métaboliques (IMC plus élevé, la prise du poids, plus le diabète) pendant la période du suivi par rapport à ceux qui n'avaient pas progressé.

Les grandes études de cohorte ont confirmé que l'apparition de la stéatose, diagnostiquée par l'imagerie, a été associée à l'aggravation des comorbidités métaboliques associées à la résistance à l'insuline (Hamaguchi, Kojima et al. 2005); à l'inverse, la résolution de la stéatose coïncide avec l'amélioration des mêmes facteurs de risque Sur la base de constatations actuelles et antérieures, nous faisons l'hypothèse que chez certains patients atteints la stéatose hépatique, la persistance ou l'aggravation de l'insulinorésistance et des facteurs de risque métaboliques (surpoids, diabète, hypertension artérielle, dyslipidémie, etc.) va favoriser la transition vers la stéatohépatite.

Un enjeu majeur des futures études sera de mieux identifier, parmi le grand nombre de patients avec stéatose non alcoolique, les personnes à risque de progression de la maladie. Les résultats présentés ici soulèvent la nécessité de réviser les recommandations actuelles qui vont contre un suivi régulier chez des patients atteints de NAFLD sans NASH (Ratziu, Bellentani et al. 2010; Chalasani, Younossi et al. 2012). Le suivi par un hépatologue, y compris la surveillance de l'insulinorésistance, des marqueurs de fibrose non invasifs et la réalisation d'une autre biopsie hépatique peut être nécessaire chez certains de ces patients même si leur évaluation initiale avait diagnostiqué une stéatose simple.

En conclusion, les données obtenues de cette étude montrent qu'une partie des patients atteints de la stéatose hépatique peut évoluer vers la stéatohépatite bien définie et chez certains patients vers la fibrose septale. Les patients atteints de la stéatose hépatique pourraient ne pas être une population homogène.

La présence d'une inflammation lobulaire minime ou de la fibrose (quelque soit le stade) augmente nettement le risque de progression histologique à moyen terme, tandis que les patients avec la stéatose isolée ont le risque plus faible. En attendant la confirmation de nos résultats par d'autres études, le suivi régulier par un hépatologue des patients atteints de la stéatose isolée pourrait être nécessaire, surtout chez les patients présentant les manifestations cliniques de progression de la maladie comme une insulinorésistance.

Chapitre VI.

Article 2: "Clinically significant variability of elastometry on short-term follow-up in patients with chronic liver diseases"

VI-1. Objectifs du travail.

L'élastographie impulsionnelle ultrasonore, ou Fibroscan®, est une des méthodes non invasives de diagnostic de la fibrose hépatique qui devient de plus en plus utilisée dans le monde. La mesure de vitesse de la propagation des ondes de cisaillement à travers le parenchyme hépatique permet d'estimer l'élasticité du foie. Cette méthode est performante pour le diagnostic d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose indépendamment de l'étiologie (Castera, Vergniol et al. 2005; Ziol, Handra-Luca et al. 2005; Corpechot, El Naggar et al. 2006; de Ledinghen, Ratziu et al. 2006; Vergara, Macias et al. 2007; Marcellin, Ziol et al. 2009) (Wong, Vergniol et al. 2010). Certaines études ont démontré la corrélation entre la valeur d'élastographie et les complications de la cirrhose telles l'hypertension portale et le carcinome hépatocellulaire (Kazemi, Kettaneh et al. 2006; Vizzutti, Arena et al. 2007; Bureau, Metivier et al. 2008; Castera, Le Bail et al. 2009) (Masuzaki, Tateishi et al. 2009; Robic, Procopet et al. 2011) (Jung, Kim et al. 2011; Kim, Lee et al. 2012) (Poynard, Vergniol et al. 2013).

En plus, des études de suivi réalisées chez les patients infectés par le VHB et le VHC ont montré une association entre les valeurs d'élastographie et les complications hépatiques à 5 ans ainsi que la mortalité (Vergniol, Foucher et al. 2011; de Ledinghen, Vergniol et al. 2013). Quelques études ont même rapporté une diminution significative des valeurs de densité hépatique pendant et après traitement antiviral, suggérant une amélioration de la fibrose du foie (Vergniol, Foucher et al. 2009) (Andersen, Weiland et al.; Enomoto, Mori et al.; Fung, Lai et al.; Hezode, Castera et al.; Kim, Park et al.; Martinez, Foucher et al.). En prenant en compte ces données, il a été recommandé de réaliser des mesures successives d'élastographie dans le cadre du suivi des patients atteints de maladie chronique du foie (Kim, Fung et al.) (Wong).

Dans cette étude, nous avons étudié la variabilité des mesures d'élastographie à court terme chez des patients dont la fibrose hépatique est stable. En raison d'évolution lente de la fibrose hépatique dans la plupart des maladies chroniques du foie, un intervalle d'un an est trop court chez les patients stables et non traités pour qu'une progression ou une régression significative de la fibrose puisse survenir. L'élastographie est considérée comme une méthode de

suivi fiable et les valeurs ne devraient pas, ou peu, changer indépendamment de l'évolution de la maladie.

Nous avons réalisé une analyse rétrospective de notre base de données des examens d'élastographie faits entre Janvier 2006 et Mars 2009 et nous avons identifiés tous les patients qui ont eu des examens successifs valides, à plus d'un jour et moins d'un an d'intervalle.

Les patients inclus ont été ceux présentant une maladie chronique du foie, stables pour les paramètres métaboliques et pour la consommation d'alcool et ne recevant pas de traitement spécifique.

Les mesures d'élastographie ont été réalisées par le FibroScan (*société Echosens, Paris, France*) avec la sonde M chez un malade à jeun en position allongée en décubitus dorsal, le bras droit sous la tête pour dégager l'hypochondre droit. Le résultat de FibroScan a été considéré interprétable si tous ces critères sont réunis: 10 mesures valides; le rapport IQR/Médiane<30% et le TdR>60%.

Durant cette étude, 14 opérateurs ont réalisé les mesures d'élastométrie et parmi ceux-là, quatre ont été considérés comme des seniors puisqu'ayant réalisé plus de 1000 examens. Les opérateurs seniors ont réalisé 71.6% des examens.

Pour évaluer les différents stades de fibrose nous avons utilisé les seuils suivant d'élastométrie: l <7kPa pour l'absence de fibrose ou la fibrose minime (F0-F1), ≥7 kPa à <9.5 kPa pour la fibrose significative (F2), ≥9.5 kPa à <12.5 kPa pour la fibrose avancée (F3), e ≥12.5 kPa à <20 kPa pour la cirrhose compensée et >20 kPa la cirrhose compliquée ou décompensée.

Après avoir exclu tous les examens de FibroScan uniques, les examens réalisés le même jour ou à plus d'un an d'intervalle, les examens invalides et les échecs, nous avons analysé 531 paires d'examens de FibroScan chez 432 patients. Les étiologies de l'hépatopathie chronique étaient: 43.1% VHC, 18.1% VHC/VIH, 16.0% NAFLD, 12.3% VHB, 3.7% maladie alcoolique du foie et 6.9% divers.

Clinically significant variability of elastometry on short-term follow-up in patients with chronic liver diseases

SHORT TITLE: Elastometry variability over short-term follow-up

Fabio Nascimbeni,[1,2] Pascal Lebray,[1] Larysa Fedchuk,[1] Claudia P. Oliveira,[3] Mario Reis Alvares-da-Silva,[4] Anne Varault,[1] Patrick Ingiliz,[1] Yen Ngo,[5] Mercedes de Torres,[1] Mona Munteanu,[5] Thierry Poynard,[1] Vlad Ratziu,[1] for the LIDO Study Group.

AFFILIATIONS:

[1] Université Pierre et Marie Curie, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpêtrière, INSERM U938, CdR Saint-Antoine, Paris, France

[2] Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

[3] University of São Paulo School of Medicine, Department of Gastroenterology, Clinical Division (LIM-07), Sao Paulo, Brazil

[4] School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Division of Gastroenterology and Hepatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

[5] BioPredictive, Paris, France

GRANT SUPPORT: Funding for this research was in part from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° HEALTH-F2-2009-241762 for the project FLIP.

ABBREVIATIONS:

ALT: alanine aminotransferase; CI: confidence interval; ICC: intraclass correlation coefficient; IQR: interquartile range; IQR/M: interquartile range/median ratio; LSM: liver stiffness measurement; SD: standard deviation; TE: transient elastography.

CORRESPONDING AUTHOR:

Vlad Ratziu

Address: Hôpital Pitié Salpêtrière, Service d'Hépatogastroentérologie, 47-83 Bd de l'Hopital, Paris 75013, France.

E-mail: vratziu@upmc.fr

Fax: +33 1 42 16 14 27

DISCLOSURES: The authors declare no conflicts of interest for the topic presented in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

F.N.: acquisition, analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting of the manuscript; **P.L.:** study concept and design; acquisition, analysis and interpretation of data; revision of the manuscript; **L.F. and M.M.:** acquisition, analysis and interpretation of data; revision of the manuscript; **C.P.O., M.R.A., A.V., P.I., Y.N. and M.d.T.:** acquisition, analysis and interpretation of data; **T.P.:** critical revision of the manuscript for important intellectual content; **V.R.:** study concept, design and supervision; analysis and interpretation of data; drafting and revision of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

ABSTRACT

Background and Aims: Transient elastometry (TE) is used for the non-invasive assessment of liver fibrosis at diagnosis and has been proposed for monitoring changes during follow-up. However, the short-term variability of repeated measurements (i.e. not attributable to changes in liver fibrosis) is unknown. **Methods:** 531 valid, paired, baseline (LSM1) and follow-up (LSM2) liver stiffness measurements by Fibroscan® >1day and <1year apart were obtained in 432 untreated, clinically stable (BMI, waist circumference, alcohol consumption), immunocompetent patients with chronic liver diseases. Variability between the first and follow-up measurements was expressed as absolute (LSM2-LSM1, kPa), relative [(LSM2-LSM1)/LSM1*100], or as a change in fibrosis stage. **Results:** Variability >20% was seen in 49.7%; >30% in 34.3%; and >50% in 12.2% of paired measurements and was constant across the spectrum of LSM1 values. This variability resulted in 1 class change in 31.5% and a ≥2 class change in 9.8% of paired measurements. Patients with an LSM1>7kPa had an increased probability of fibrosis class change on LSM2. Predictors of variability were: two different operators, at least one non-senior operator, the interquartile range/median ratio, significant fibrosis on LSM1 (≥7 kPa), baseline BMI, and doubling of ALT between paired measurements. Restricting the analyses to paired measurements performed by the same operator modestly reduced the variability, with a one-class change in 26% of cases. ***Conclusions***: Monitoring of fibrosis by TE can be altered by clinically significant variability unrelated to the natural course of the disease and associated with operator and patient-related factors. The lowest variability is seen in patients with no/early fibrosis and TE performed by a single experienced operator.

KEYWORDS: liver fibrosis markers; liver stiffness; body mass index; aminotransferases.

Transient elastometry (TE) is an increasingly popular method for the non-invasive assessment of liver fibrosis. It measures the velocity of shear waves propagating through the liver, which is directly related to tissue stiffness and hence provides an indication on tissue fibrosis. It has good overall accuracy for the diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis, independent of the underlying etiology.(Castera, Vergniol et al. 2005; Ziol, Handra-Luca et al. 2005; Corpechot, El Naggar et al. 2006; de Ledinghen, Douvin et al. 2006; Vergara, Macias et al. 2007; Marcellin, Ziol et al. 2009; Wong, Vergniol et al. 2010) Some studies have shown correlations between TE values and complications of cirrhosis such as portal hypertension and hepatocellular carcinoma.(Kazemi, Kettaneh et al. 2006; Vizzutti, Arena et al. 2007; Bureau, Metivier et al. 2008; Castera, Le Bail et al. 2009; Masuzaki, Tateishi et al. 2009; Jung, Kim et al. 2011; Robic, Procopet et al. 2011; Kim, Lee et al. 2012; Poynard, Vergniol et al. 2013) Moreover, studies performed in HBV and HCV patients have shown an association with 5-year outcomes and survival and thus suggested a prognostic value of TE measurements. (Vergniol, Foucher et al. 2011; de Ledinghen, Vergniol et al. 2013) A few studies have even documented a significant reduction in liver stiffness measurement (LSM) values during and after antiviral treatment, suggestive of an improvement in fibrosis.(Vergniol, Foucher et al. 2009; Enomoto, Mori et al. 2010; Kim, Park et al. 2010; Andersen, Weiland et al. 2011; Fung, Lai et al. 2011; Hezode, Castera et al. 2011; Martinez, Foucher et al. 2012) Based on these data it has been proposed that repeated TE measurements could be useful for the monitoring of patients with chronic liver disease, in addition to providing a one point in time estimate of fibrosis stage.(Kim, Fung et al. 2013; Wong 2013) For this to be valid, however, changes in LSM should not be prone to substantial analytical variability as they should rather reflect true variation in the course of the disease. Remarkably, the variability of LSM unrelated to disease progression/regression is unknown.

In this study we attempted to examine the variability of short-term TE measurements in patients with no or minimal progression/regression of chronic liver disease. We assumed that,

due to the slow course of liver fibrosis in most chronic liver diseases, an interval of one year or less is too short for the occurrence of meaningful progression or regression of fibrosis in untreated patients with stable condition. The assumption is that for TE to be a reliable monitoring tool, LSM values should not, or only minimally, fluctuate independent of the course of the disease, and that only a minority of patients should have changes in LSM within a clinically relevant range.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We retrospectively analyzed our database of TE examinations done between January 2006 and March 2009 and identified all adult patients who had undergone repeated, successful LSM more than one day and less than one year apart. All chronic liver disease etiologies were included as long as patients were not receiving any specific treatment including anti-viral therapy for chronic viral hepatitis, thiazolidinedione, vitamin E, DPP-4 inhibitors or GLP-1 analogues for NASH and endoscopic treatment for chronic cholestatic liver diseases. Only immunocompetent patients (non-transplanted and CD4 count >300/mm^3 for HIV-HCV coinfected) with stable alcohol consumption (±20 g/day) between the baseline and follow-up LSM were included. No specific dietary interventions or physical activity programs were implemented in these patients. Patients with decompensated cirrhosis, including ascites, were not included, as well as patients with hepatitis flare-ups, acute liver diseases or unstable clinical conditions.

The following clinical and laboratory parameters at the time of each LSM were recorded: age, sex, height, weight, body mass index, waist circumference, thoracic fold thickness, alanine aminotransferase (ALT) and SteatoTest, cause of liver disease and TE operator. Because anthropometric measurements and biochemical data were not available for all examinations, the effects of absolute and relative changes of these variables between baseline and follow-up paired TE were studied in the subgroups of examinations with a complete dataset.

Liver stiffness measurements

LSM were performed using FibroScan® with an M probe (Echosens, Paris, France) placed perpendicularly on the skin at the level of the right lobe of the liver, through the intercostal space generally used for liver biopsy (i.e., intersection between the xyphoid line and the median axillary line), in a typically fasting patient, lying in the supine position and the right arm in maximal abduction. The operator, assisted by a time-motion ultrasound image, identified a liver portion free of large vascular structures and minimally affected by respiratory phases for

LSM acquisition. LSM were considered successful if at least 10 shots were valid, the success rate (ratio of valid shots to the total number of shots) was at least 60% and the interquartile range was less than 30% of the median LSM value (IQR/M). Therefore, no repeated measurements were done because the first assessment was considered technically flawed or unreliable. In our department, at the time of this study, empirical fibrosis monitoring practices consisted in repeating the non-invasive assessment after 6 months to 1 year. In other patients, repeated non-invasive assessment was performed because of inclusion in clinical trials, either observational or interventional (therapeutic), or upon patient request, or because of perceived discordant results with other non-invasive serum markers, or because of the investigator's willingness to check results indicative of advanced fibrosis. During the study period, a total of 14 operators performed the TE measurements. Operators were defined as senior or non-senior according to their experience (more vs. less than 1000 examinations performed). Variability between baseline and follow-up paired LSM was defined as absolute (LSM2-LSM1, in kPa), relative [percent change from first measurement, (LSM2-LSM1)/LSM1*100], or as a change in fibrosis stage. We considered the following cut-off values of LSM for fibrosis stages: <7 kPa for absent or mild fibrosis (F0-F1), ≥7 to <9.5 kPa for significant fibrosis (F2), ≥9.5 to <12.5 kPa for severe fibrosis (F3), ≥12.5 to <20 kPa for early cirrhosis and ≥20 kPa for advanced cirrhosis. Because the great majority of our patients were HCV mono- or co-infected, we choose to extend Castera's well validated LSM cut-offs to all liver disease etiologies.(Castera, Vergniol et al. 2005) Moreover, given the growing body of evidence suggesting that cirrhosis is far from being a single stage(Garcia-Tsao, Friedman et al. 2010) and that LSM is a reliable prognostic quantitative marker for occurrence of liver-related complications and death,(Vizzutti, Arena et al. 2007; Masuzaki, Tateishi et al. 2009; Poynard, Vergniol et al. 2013) we decided to split F4 stage in two different categories (early and advanced cirrhosis). We choose the cut-off of 20 kPa, since several studies have suggested that LSM values around this limit are associated with

development of esophageal varices and liver-related complications.(Kazemi, Kettaneh et al. 2006; Bureau, Metivier et al. 2008; Castera, Le Bail et al. 2009; Robic, Procopet et al. 2011)

Statistical analysis

In descriptive analyses, continuous variables were expressed as mean±standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR), as appropriate, and categorical variables as frequency and percentage. All statistical analyses were performed with LSM variability between baseline and follow-up paired TE as the outcome, and with age, sex, etiology of liver disease, time interval between TE1 and TE2, different operators between TE1 and TE2, at least one less experienced operator in TE1 or TE2, maximum IQR/M and success rate between paired readings, and fibrosis class at TE1 as explanatory factors in the total number of examinations. Baseline BMI, waist circumference, thoracic fold thickness, ALT and SteatoTest values and absolute and relative changes of these variables between paired TE1 and TE2 were additional explanatory factors. The most significant discriminant cut-off values for relative changes were chosen. Comparisons between paired variables at TE1 and TE2 were performed using paired sample t-test and McNemar tests if variables were numerical or categorical, respectively. Correlations of LSM values and fibrosis classes obtained at the two readings were assessed with the Spearman's rank test and Kendall's tau-b test, respectively. Moreover, the Bland-Altman graphic was plotted and inter-rater agreement was assessed using Kappa index and intra-class correlation coefficient (ICC). Numerical variables were compared using the Student's t-test for those that were normally distributed, and the Mann-Whitney U test for those without normal distribution. The chi-square and Fisher's exact tests were used for qualitative data when appropriate. Two-sided p-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Finally, binary logistic regression analyses were used with those factors that were significantly associated with the outcomes in univariate analyses, whenever appropriate (i.e. clinical relevance and avoidance of co-linearity). Odds ratios were estimated from the models and were given with their 95%

confidence intervals (CI). Several sensitivity analyses were performed to evaluate the weight of a single variable on LSM variability (in particular weight changes and inter-operator variability). Finally, we performed further subanalyses with etiology-specific LSM thresholds for chronic hepatitis C, chronic hepatitis B and NAFLD. These three etiologies of liver disease had a good representation in our cohort and have well-characterized and quite different LSM cut-offs. For mono-infected chronic hepatitis C patients we choose the above-mentioned Castera's cut-offs (<7.1 kPa for F0-F1, ≥7.1 to <9.5 kPa for F2, ≥9.5 to <12.5 kPa for F3 and ≥12.5 for F4);(Castera, Vergniol et al. 2005) for chronic HBV infection we used <7.2 kPa for F0-F1, ≥7.2 to <8.1 kPa for F2, ≥8.1 to <11.0 kPa for F3 and ≥11.0 for F4, according to Marcellin et al;(Marcellin, Ziol et al. 2009) and for NAFLD patients <5.8 kPa for F0-F1, ≥5.8 to <7.9 kPa for F2, ≥7.9 to <10.3 kPa for F3 and ≥10.3 for F4, according to Wong et al.(Wong, Vergniol et al. 2010)

Statistical tests were performed using SPSS 17.0 software (SPSS, Inc, Chicago, Ill, USA).

RESULTS

Study population

After exclusion of single TE, paired TE performed on the same day or more than one year apart, failed or unreliable TE and patients with specific etiologic treatment, 531 paired TE from 432 patients were analyzed **(Supplementary Figure 1)**. 353 patients had 1 pair of TE, 65 patients had 2 pairs, 9 patients had 3, 4 patients had 4 and 1 patient had 5 pairs of TE. The majority of patients were male (71.3%), and the mean age was 50.6±11.4 years. The causes of liver disease were as follows: 43.1% chronic HCV infection, 18.1% HIV-HCV co-infection, 16.0% NAFLD, 12.3% chronic HBV infection, 3.7% chronic alcoholic liver disease and the remaining 6.9% miscellaneous etiologies. The mean time interval between paired TE was 7.8±3.4 months (median [IQR]: 8.3 [5.6-10.9]). The same operator performed the baseline and the follow-up readings in 31.8% of cases. Of the 14 operators, 4 were considered to be senior, having executed more than 1000 examinations. These senior operators performed 71.6% of paired TE.

At the time of the first examination, the mean LSM value was 10.2±10.0 kPa (median [IQR]: 7.0 [5.6-10.2]); the mean IQR/M was 15.7±6.9%, and mean success rate was 93.6±10.3%. Half of the measurements were classified as absent/mild fibrosis (i.e. LSM<7 kPa); 21.1% as significant fibrosis (LSM between 7 and 9.5 kPa); 12.4% as severe fibrosis (9.5-12.5 kPa); and 7.7% and 8.9% as early (12.5-20 kPa) and advanced (>20 kPa) cirrhosis, respectively. Mean LSM, IQR/M, success rate and frequency of fibrosis classes did not significantly change between the baseline and follow-up readings **(Table 1)**. However, the correlation/agreement between baseline and follow-up LSM was only moderate, as assessed through the Spearman's rank test (r: 0.674, p<0.001) and the ICC (ICC 0.75; 95%CI 0.71-0.79) and as suggested by the presence of several outliers (22) in the Bland-Altman plot **(Supplementary Figure 2a and 2b)**. Also, the correlation between baseline and follow-up fibrosis classes was only fair (Kendall's tau-b: 0.612, p<0.001) **(Supplementary Table 1)**. In addition, inter-rater reliability between paired readings

ranges from fair to moderate, k values being 0.38, 0.55, 0.60 and 0.64 for any grade of fibrosis, for fibrosis stages F≥2, for fibrosis stages F≥3 and for cirrhosis, respectively.

Overall changes between liver stiffness measurements

The mean absolute difference between LSM1 and LSM2 was 3.2±6.1 kPa, equally distributed among positive (LSM1>LSM2) and negative (LSM1<LSM2) changes (data not shown). A relative discordance >20% occurred in 49.7% (264/531) of paired readings, a discordance >30% in 34.3% and one >50% in 12.2%. The mean absolute difference according to baseline fibrosis class was 1.4±1.7 kPa for absent/mild fibrosis; 2.7±6.9 kPa for significant fibrosis; 3.4±2.8 kPa for severe fibrosis; and 5.2±3.7 kPa and 12.4±12.7 kPa for early and advanced cirrhosis, respectively. The absolute difference in kPa was directly correlated with LSM1 **(Figures 1a and 1c)**. Conversely, the relative difference was high throughout the spectrum of LSM1 values **(Figures 1b and 1d),** with a mean relative difference between the two paired readings as high as 29.4±48.0%. Altogether, these findings resulted in one fibrosis class change in 31.5% of paired examinations (167/531), and a 2 or more class change in 9.8%. There was a significant positive correlation between LSM1 values and fibrosis class changes (r=0.414, p<0.001), and the higher the decile of LSM1, the greater the probability of class changes **(Figure 2a)**. Patients with significant or severe fibrosis had an alarmingly high rate of ≥1 fibrosis class change on a second TE measurement **(Figure 2b)**. **Figure 2a** shows that only patients with an LSM1<6.5kPa had a reduced probability of fibrosis class change on repeated measurement. The best LSM1 cut-off value for predicting at least one fibrosis class change between the two paired readings was 7.15 kPa, which was close to the cut-off value for significant fibrosis **(Supplementary Figure 3)**.

The sub-analyses performed considering different groups according to maximum IQR/M between baseline and follow-up TE displayed an increasing prevalence of discordance and fibrosis class changes for higher IQR/M groups **(Figure 3 and Supplementary Material).**

When comparing paired examinations performed less and more than 6 months apart, the only significant difference was that there were higher baseline elastographic values in paired readings performed less than six months apart. However, the results were qualitatively similar to those of the whole cohort **(Supplementary Material).**

Table 1 shows the baseline and follow-up mean±SD values of anthropometric and biochemical variables in paired TE readings. Overall, there were no significant modifications between first and second TE readings for mean weight, BMI, waist circumference, thoracic fold thickness, ALT, SteatoTest or alcohol consumption. With regard to ALT levels, 88 paired readings had ALT≥100 UI/L, and only 22 ≥200 UI/L, at baseline and/or follow-up TE.

Factors associated with variability between baseline and follow-up paired liver stiffness measurements

We first assessed the determinants of >20%, >30% and >50% relative discordance **(Supplementary Table 2 and Table 2)**. Both the presence of two different operators and at least one non-senior operator were significantly associated with >20% and >30% discordance; the latter was also a risk factor for >50% discordance. The maximum IQR/M was significantly associated with >20% and >30% discordance, whereas success rate was not. A shorter time interval between TE measurements was associated with a higher discordance rate; this however could be confounded by the higher baseline LSM values in paired readings with shorter follow-up and by the level of experience of the operators. Indeed, paired TE readings with at least one non-senior operator were done closer together than those with two senior operators (median [IQR]: 7.2 [4.8-10.3] vs. 8.8 [5.9-11.0] months, respectively; p=0.004). With regard to fibrosis stage at the first reading, discordance >20% and >30% were more strongly associated with the presence of at least severe fibrosis (≥9.5 kPa), whereas discordance >50% was more significantly associated with cirrhosis (≥12.5 kPa).

Sex, age and etiology of chronic liver disease did not emerge as significant factors of variability. While BMI, waist circumference, thoracic fold thickness, ALT and SteatoTest values

were not associated with variability, changes in BMI and waist circumference between the paired readings were significantly associated with >20% discordance. Both a relative change ≥7% in BMI and ≥10% in waist circumference were risk factors for >20% discordance and of >30% discordance for the former. Variations in thoracic fold thickness and SteatoTest did not emerge as significant risk factors for any discordance rate. Doubling of ALT was a risk factor for both >20% and > 30% discordance. **Table 2** shows the results of multivariate analyses, adjusted for sex, age and time between TE measurements.

We next assessed the factors associated with fibrosis class changes (at least one, and two or more) because of the clinical relevance of such modifications for patient follow-up **(Supplementary Table 3 and Table 3)**. In univariate analyses, sex, age and etiology of liver disease were not determinants of fibrosis class changes. Both at least one and ≥2 fibrosis classes changes were significantly associated with a less experienced operator. Different operators and maximum IQR/M between paired examinations were risk factors for at least one fibrosis class change; the success rate was not. Again, a longer time interval between TE measurements minimized fibrosis classes changes. With regard to fibrosis stage at the first reading, at least one fibrosis class change was associated with significant fibrosis (≥7 kPa), whereas two or more classes changes were associated with severe fibrosis (≥9.5 kPa). The baseline BMI, the doubling of ALT and relative changes ≥10% in SteatoTest between the two TE were significantly associated with at least one fibrosis class change. No associations were found between other anthropometric or biochemical variables and ≥2 fibrosis class changes. **Table 3** shows the results of multivariate analyses, adjusted for sex, age and time between examinations. The time interval between LSMs was not predictive of fibrosis class changes in multivariate analyses.

Determinants of variability in paired examinations without significant modifications of BMI

To rule out the effect of weight changes on LSM variability, we assessed the factors associated with variability among the 312 paired TE readings with stable BMI (less than 5% change in BMI) **(Supplementary Table 4)**. Despite BMI stability, 47.8% of paired examinations

showed a >20% discordance, 31.4% a >30% and 10.6% a >50% discordance. This resulted in a >1 fibrosis class change in 32.4% paired readings and in a ≥2 fibrosis class change in 8.3%. The presence of two different operators was significantly associated with a discordance rate of >20%, but not with fibrosis class changes. Age, sex, etiology of liver disease, IQR/M and success rate were not associated with any outcomes. With regard to fibrosis stage at LSM1, cirrhosis (≥12.5 kPa) was associated with relative variability, significant fibrosis (≥7 kPa) with ≥1 fibrosis class change, and severe fibrosis (≥9.5 kPa) with ≥2 classes changes. Doubling of ALT and a 10% change in Steatotest also had an impact on fibrosis class changes. Multivariate analyses were not performed due to small sample size.

Determinants of variability in paired examinations performed by the same operators

Similarly, to rule out the effect of inter-operator variability on paired LSM, we assessed the determinants of variability between baseline and follow-up paired readings when performed by the same operators in 169 paired TE measurements; all but 4 of them were performed by senior operators **(Supplementary Table 5)**. Discordance rates >20%, >30% and >50% were still found in 39.6%, 27.2% and 9.5% pairs, respectively, which resulted in fibrosis class change of one (26.0%) or ≥2 classes (8.3%). Maximum IQR/M was significantly associated with >20% and >30% discordance and with one or more fibrosis classes change. The time interval between TE measurements was not predictive of any outcomes, further confirming that it was a confounding factor related to the higher number of senior operators. Even when the same (senior) operator performed both TE readings, the fibrosis stage at LSM1 was associated with variability of TE readings: significant fibrosis (≥7 kPa) was associated with >1 fibrosis class change, severe fibrosis (≥9.5 kPa) with >20% discordance and with >2 fibrosis class changes, and cirrhosis (≥12.5 kPa) with >50% discordance. Absolute and relative BMI changes were associated with >20% discordance. Here again, the doubling of ALT was associated with 20% and 30% discordance and with one or more fibrosis classes change. Multivariate analyses were not performed due to small sample size.

Fibrosis class changes according to disease-adjusted LSM cut-offs

To confirm that LSM variability occurs in a substantial proportion of cases independent of the etiology of the liver disease and LSM cut-offs, we assessed the frequency of fibrosis class changes in paired readings from mono-infected HCV, HBV and NAFLD patients, respectively, using the specific LSM categories detailed in the methods section.

Among 232 paired readings in patients with chronic HCV, we found 27.2% one fibrosis class change and 10.8% two or more class change. Similarly, the 64 paired examinations in chronic HBV patients showed one fibrosis class change in 21.9% of cases and a two or more class change in 14.1%. Finally, we found one fibrosis class change in 36.7% and two or more fibrosis class change in 8.9% of the 79 paired readings from patients with NAFLD.

Overall, in these 375 paired readings reanalyzed according to etiology-specific thresholds, discordance between no-mild fibrosis (F0-1 for HCV and HBV, F0-2 for NAFLD) and significant fibrosis (F2-4 for HCV and HBV, F3-4 for NAFLD) occurred in 83 cases (22.1%). 34 paired readings (9.1%) showed a discordance for the diagnosis of cirrhosis (F4).

DISCUSSION

This study demonstrates a substantial variability of repeated, short-term, TE measurements, in patients with chronic liver diseases. We are confident that these changes in elastometry do not reflect bona fide changes in liver fibrosis, as our selection criteria minimized the risk of fibrosis progression/regression during the study period. Indeed, a time interval of less than one year (median 8 months) is a very short time compared to the natural history of most chronic liver diseases in which discernible changes in fibrosis take decades to occur. Moreover, the selection of immunocompetent patients, untreated for their chronic liver disease and with stable anthropometric and metabolic parameters and daily alcohol consumption, further reduced the possibility of meaningful fibrotic disease progression. The significant variability of TE measurements unrelated to disease progression/regression shown in this study highlights the limitations of elastometry used alone as a fibrosis monitoring tool. We also identified some of the determinants of the analytical variability of TE measurements that should incite caution when interpreting repeated measurements.

While histological staging is semi-quantitative, elastometry-based methods have the theoretical advantage of providing a quantitative assessment of liver fibrosis expressed in kPa. Clinicians may be tempted to rely on the absolute kPa value to evaluate the amount of fibrosis and also to predict fibrotic disease progression based on absolute kPa changes during monitoring. This study has shown that such an approach needs cautious interpretation, as relative changes in sequential measurements can be more than 20% in as many as half of tested patients and more than 30% in a third of them. Interestingly, the whole spectrum of elastometry values is prone to such variability, as shown in Figure 1D, in which the relative change in elastometric readings is remarkably constant in patients with low, intermediate or high stiffness values. This suggests that the variability in tissue stiffness (either due to biological reasons or due to analytical methods of measurement) is a general phenomenon occurring at all stages of fibrosis and not limited to patients with advanced fibrosis only. Therefore, clinicians should not rely on absolute or relative

changes in elastometry for patient monitoring. An alternative option is to consider fibrosis class changes, which has higher clinical relevance, albeit a lower sensitivity to change. Even by this standard, a third of sequential measurements incorrectly diagnosed a one-stage fibrosis change. In contrast, a two-class change was marginal (<10%), and therefore most probably associated with real disease change.

Importantly, we inquired whether fibrosis class changes due to short-term variability of elastometry occurred more or less frequently for a particular range of LSM values. These data show that patients with an LSM value <6.5 kPa had a significantly lower prevalence of fibrosis class change at a subsequent LSM measurement than patients with LSM >6.5 kPa. Thus, an increase or a decrease in elastometry values compatible with a one-class change in fibrosis is more likely to reflect true disease progression/regression in patients with no or early fibrosis (corresponding to an approximate value below 7 kPa with the most likely accepted thresholds). In patients with significant or advanced fibrosis (baseline LSM >7 kPa), the probability that this can be explained by intrinsic variability of elastometry measurements is much higher. Univariate and multivariate analyses strengthened these conclusions by identifying significant fibrosis on the first elastometry assessment as a factor of substantial short-term variability (percent change in LSM or fibrosis class change) on a subsequent measurement. These data provide important clarifications on the interpretation of longitudinal follow-up by elastometry for the purpose of assessing liver fibrosis.

We identified several procedure and patient-related determinants of substantial variability of LSM values independent from actual changes in the underlying liver fibrosis. One such factor was operator-dependence. We found that having different operators and/or less-experienced operators was a major predictor of variability of TE measurements. This was surprising, as TE is considered an operator-independent, highly reproducible and user-friendly method, requiring a short learning curve and with an excellent intra- and inter-observer agreement.(Fraquelli, Rigamonti et al. 2007; Boursier, Konate et al. 2008; Boursier, Konate et al. 2008; Neukam,

Recio et al. 2010) Previous investigators have challenged this view: Castera et al. showed that operator experience strongly impacted LSM failure rate and unreliable results.(Castera, Foucher et al. 2010) Poynard et al. described an operator effect as a significant cause of discordance between LSM and serum fibrosis markers.(Poynard, Ingiliz et al. 2008) Finally, Roca et al. and Perazzo et al. have recently disputed LSM reproducibility suggesting that inter-operator disagreement could be more common than generally reported.(Roca, Resino et al. 2012; Perazzo, Fernandes et al. 2014) Our data, together with theirs, ask for a more balanced view, emphasize the importance of a much higher number of examinations for considering someone an experienced operator, and the need for clinicians to pay particular attention to the operators when interpreting dynamic changes of TE measurements. Restricting the analysis to the same, experienced operator somehow reduced the variability (a one-class change in only a quarter of patients), but this is still a high value that can impact the clinical relevance of the findings. The finding that IQR/M is a robust predictor of TE variability is germane to the finding of operator dependency and is another indication that the quality of the TE examination is critical. Much more than the arbitrarily chosen "success rate", the IQR/M has been shown by others to be a key quality control independently associated with the risk of discordance with histology (Lucidarme, Foucher et al. 2009; Myers, Crotty et al. 2010) or with inter-observer discrepancy.(Boursier, Konate et al. 2008) Our data showing that the lower is the IQR/M, the lower is the variability, suggest that careful consideration of this variable is also critical to the correct interpretation of follow-up TE measurements.

Among patient-related factors, BMI is consistently associated with discordant TE readings, even though BMI changes in this population were minimized by the selection criteria. However, BMI changes were not a major explanation of intrinsic variability of TE measurements, since the latter persisted with a similar magnitude, even after strictly defining BMI stability between measurements. ALT flares, as a surrogate of necroinflammatory activity, have been shown by others to interfere with liver stiffness.(Coco, Oliveri et al. 2007; Arena, Vizzutti et al.

2008; Sagir, Erhardt et al. 2008) Interestingly, the present data show that even a small increase in ALT levels (such as a doubling of baseline values) have a non-negligible impact on the ability of TE to reliably diagnose changes in liver stiffness.

This study has several strengths. It tested a large number of paired TE measurements not limited to a particular etiology of chronic liver diseases, which makes the findings of this report generalizable. It reports on extensive analyses to characterize potential discordance between baseline and follow-up TE measurements in terms of absolute and relative change and fibrosis class changes. Patients were well documented for confounding profibrotic factors, as well as factors known to confound liver stiffness measurements. Several limitations should be mentioned including, first, the retrospective design that calls for a prospective confirmation of our findings. Second, the lack of histological documentation that could have confirmed the actual lack of progression /regression of fibrosis during the short study period. Also, we only studied the M probe, and therefore cannot prove that our findings also apply to the XL probe. Finally, a large majority, but not all patients, were fasting because at the time when the study was performed the impact of meal was unknown. However, the reported difference between fast and feed state is minimal.(Arena, Lupsor Platon et al. 2013)

In conclusion, there is a strong medical need for reliable, non-invasive methods of fibrosis progression monitoring. This need will only increase in the next years with the advent of efficient but expensive medications for chronic liver diseases. Elastometry has gained widespread acceptance for the baseline assessment of liver fibrosis but to what extent changes in elastometry reflect changes in fibrosis on follow-up has not been studied. Here we show that there is a large intrinsic variability of repeated elastometry measurements that is not related to changes in fibrosis. In particular, patients with stiffness values higher than 7 kPa and exams by different operators are at high risk of non-fibrosis related LSM variability. Moreover, LSM changes should be carefully interpreted on an individual case basis, taking into account changes in BMI, ALT and the IQR/M values between exams. Despite the quantitative nature of liver

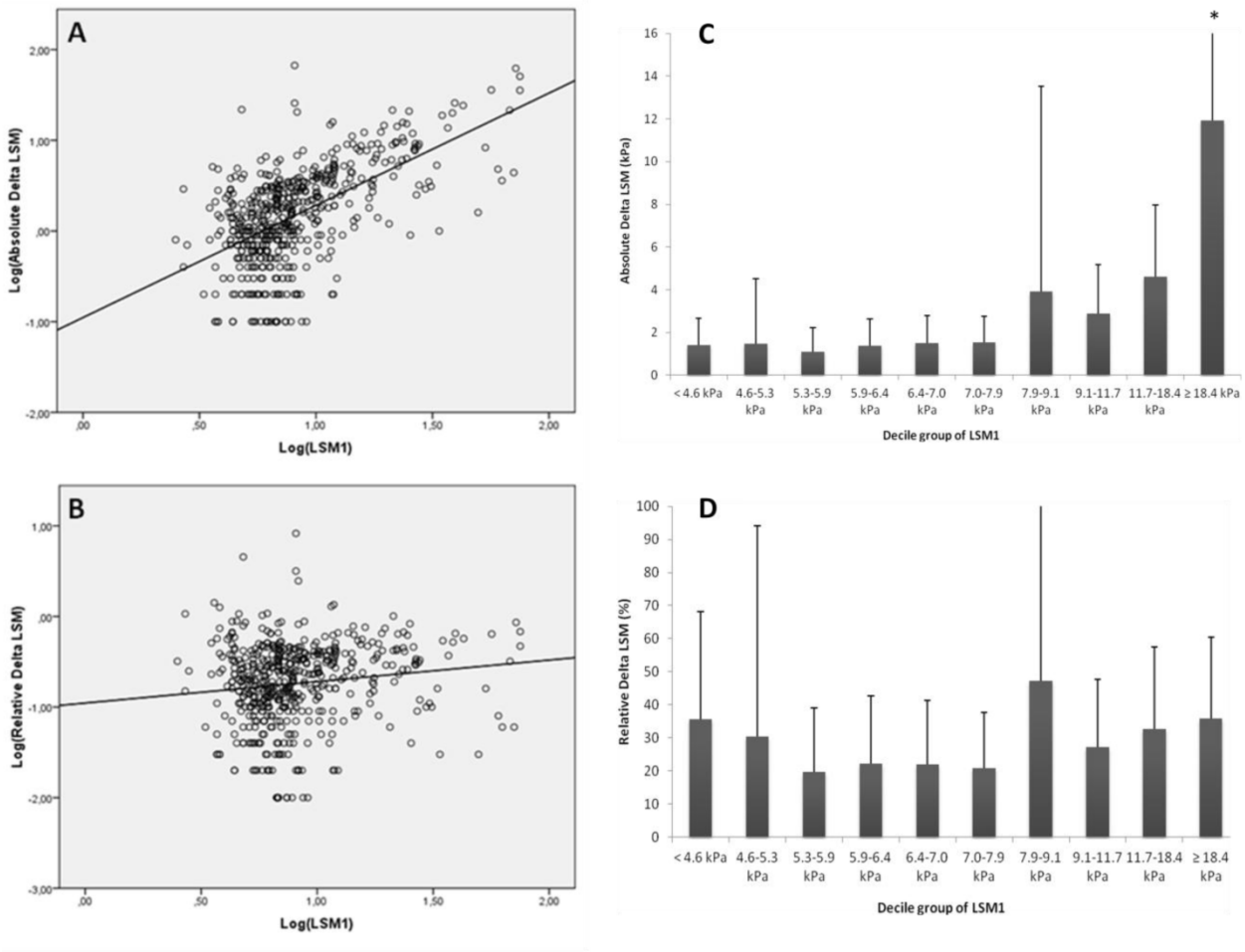
stiffness, we recommend that, for monitoring purposes in the clinic, only changes in fibrosis class should be given full consideration. This study shows that elastometry alone may not be sufficient for a reliable follow-up of fibrosis in patients with chronic liver diseases. Testing whether the combination of elastometry with a different non-invasive method would provide a more accurate reflection of fibrosis progression is worthy of future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

Members of the LIDO (Liver Injury in Diabetes and Obesity) Study Group: André Grimaldi, Philippe Giral, Eric Bruckert, Arnaud Basdevant, Karine Clement, Agnès Hartemann-Heurtier, Fabrizio Andreelli, Sophie Gombert, Sophie Jacqueminet, Arnaud Cocaul, Fabienne Fouffelle, Joseph Moussalli, Dominique Thabut, Pascal Lebray, Philippe Podevin, Dominique Bonnefont-Rousselot, Randa Bittar, Yves Benhamou, Carole Bernhardt, Hôpital Pitié-Salpêtrière; Christian Boitard, Etienne Larger, Agnès Sola, Martine El-Etr, Hôpital Hotel-Dieu; Jean-François Gautier, Hôpital Saint-Louis; Lawrence Serfaty, Chantal Housset, Jacqueline Capeau, Hôpital Saint-Antoine, all in Paris, France.

FIGURES

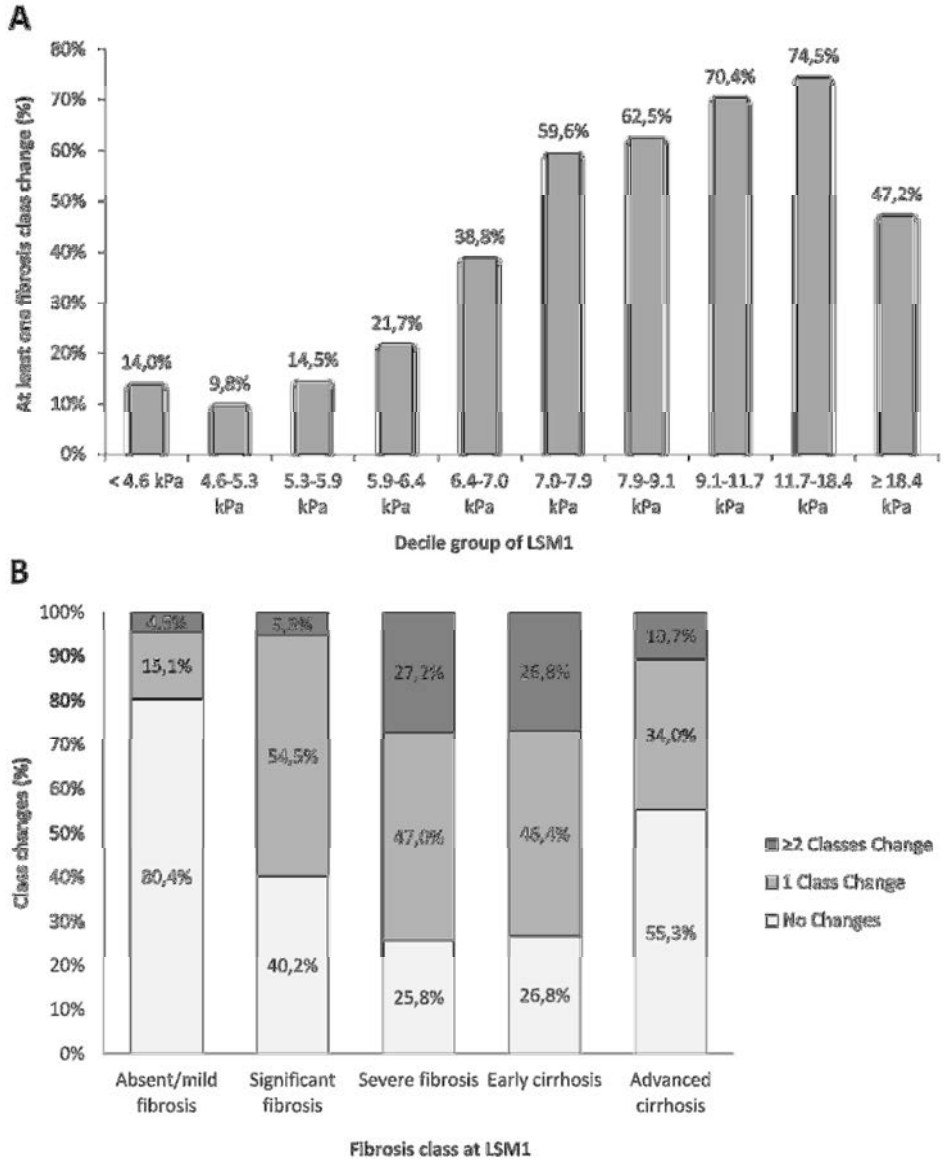
Figure 1. Correlation between baseline liver stiffness measurement (LSM1) and variability between paired liver stiffness measurements.



A. Scatter plot representing the correlation between logarithmic baseline liver stiffness measurement (LSM1) and logarithmic absolute variability [log(LSM2-LSM1)] between paired liver stiffness measurements (r: 0.542; $p < 0.001$). **B.** Scatter plot representing the correlation between logarithmic baseline liver stiffness measurement (LSM1) and logarithmic relative variability {log[(LSM2-LSM1)/LSM1*100]} between paired liver stiffness measurements (r: 0.150; $p = 0.001$). **C.** Bar graph representing the correlation between the percentile group (decile) of baseline liver stiffness measurement (LSM1) and mean+SD absolute variability (LSM2-LSM1) between paired liver stiffness measurements. ANOVA p for trend <0.001. * 10^{th} decile group significantly differs from other groups according to one-way ANOVA test with

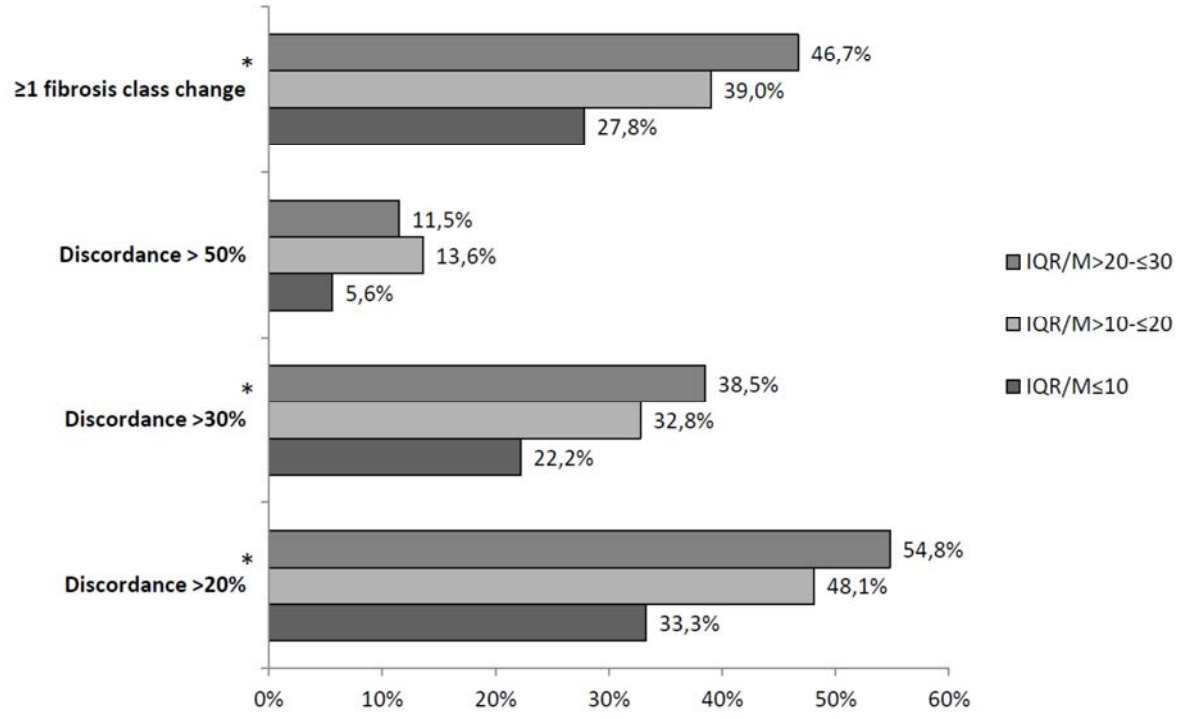
post-hoc Bonferroni analysis ($p < 0.001$). **D.** Bar graph representing the correlation between the percentile group (decile) of baseline liver stiffness measurement (LSM1) and mean+SD relative variability [(LSM2-LSM1)/LSM1*100] between paired liver stiffness measurements. ANOVA p for trend: 0.234. No significant differences were found between decile groups according to one-way ANOVA test with post-hoc Bonferroni analysis.

Figure 2. Fibrosis class changes between baseline and follow-up paired liver stiffness measurements according to baseline liver stiffness measurement (LSM1) decile group and baseline fibrosis class



A. Bar graph representing the percentage of at least one fibrosis class change between paired liver stiffness measurements according to baseline decile group of liver stiffness measurement (LSM1). The higher is the decile group, the greater the probability of at least one fibrosis class change between the two readings (chi-square p for trend < 0.001). **B.** Bar graph representing the percentage of class changes according to baseline fibrosis class. Chi-square p for trend < 0.001.

Figure 3. Prevalence of variability according to maximum IQR/M between paired liver stiffness measurements



* Chi-square p for trend <0.05 for discordance >20%, >30% and ≥1 fibrosis class change.

REFERENCES

1. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 2005;41:48-54.
2. Castera L, Vergniol J, Foucher J, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. Gastroenterology 2005;128:343-350.
3. Marcellin P, Ziol M, Bedossa P, et al. Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B. Liver Int 2009;29:242-247.
4. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 2006;41:175-179.
5. Vergara S, Macias J, Rivero A, et al. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. Clin Infect Dis 2007;45:969-974.
6. Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, et al. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. Hepatology 2006;43:1118-1124.
7. Wong VW, Vergniol J, Wong GL, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2010;51:454-462.
8. Kazemi F, Kettaneh A, N'Kontchou G, et al. Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices. J Hepatol 2006;45:230-235.
9. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, et al. Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. Hepatology 2007;45:1290-1297.
10. Bureau C, Metivier S, Peron JM, et al. Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease. Aliment Pharmacol Ther 2008;27:1261-1268.
11. Castera L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, et al. Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. J Hepatol 2009;50:59-68.
12. Robic MA, Procopet B, Metivier S, et al. Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: a prospective study. J Hepatol 2011;55:1017-1024.
13. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. Hepatology 2009;49:1954-1961.
14. Jung KS, Kim SU, Ahn SH, et al. Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan). Hepatology 2011;53:885-894.
15. Kim SU, Lee JH, Kim do Y, et al. Prediction of liver-related events using fibroscan in chronic hepatitis B patients showing advanced liver fibrosis. PLoS One 2012;7:e36676.
16. Poynard T, Vergniol J, Ngo Y, et al. Staging chronic hepatitis C in seven categories using fibrosis biomarker (FibroTest) and transient elastography (FibroScan). J Hepatol 2013.
17. Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. Gastroenterology 2011;140:1970-1979.
18. de Ledinghen V, Vergniol J, Barthe C, et al. Non-invasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year survival of patients chronically infected with hepatitis B virus. Aliment Pharmacol Ther 2013;37:979-988.

19. Vergniol J, Foucher J, Castera L, et al. Changes of non-invasive markers and FibroScan values during HCV treatment. J Viral Hepat 2009;16:132-140.
20. Hezode C, Castera L, Roudot-Thoraval F, et al. Liver stiffness diminishes with antiviral response in chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol Ther 2011;34:656-663.
21. Martinez SM, Foucher J, Combis JM, et al. Longitudinal liver stiffness assessment in patients with chronic hepatitis C undergoing antiviral therapy. PLoS One 2012;7:e47715.
22. Enomoto M, Mori M, Ogawa T, et al. Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy. Hepatol Res 2010;40:853-861.
23. Kim SU, Park JY, Kim do Y, et al. Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression. Hepatol Int 2010;4:673-680.
24. Fung J, Lai CL, Wong DK, et al. Significant changes in liver stiffness measurements in patients with chronic hepatitis B: 3-year follow-up study. J Viral Hepat 2011;18:e200-e205.
25. Andersen ES, Weiland O, Leutscher P, et al. Low liver stiffness among cirrhotic patients with hepatitis B after prolonged treatment with nucleoside analogs. Scand J Gastroenterol 2011;46:760-766.
26. Kim BK, Fung J, Yuen MF, et al. Clinical application of liver stiffness measurement using transient elastography in chronic liver disease from longitudinal perspectives. World J Gastroenterol 2013;19:1890-1900.
27. Wong GL. Transient elastography: Kill two birds with one stone? World J Hepatol 2013;5:264-274.
28. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, et al. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. Hepatology 2010;51:1445-1449.
29. Boursier J, Konate A, Guilluy M, et al. Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography. Eur J Gastroenterol Hepatol 2008;20:693-701.
30. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. Gut 2007;56:968-973.
31. Boursier J, Konate A, Gorea G, et al. Reproducibility of liver stiffness measurement by ultrasonographic elastometry. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1263-1269.
32. Neukam K, Recio E, Camacho A, et al. Interobserver concordance in the assessment of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using transient elastometry. Eur J Gastroenterol Hepatol 2010;22:801-807.
33. Castera L, Foucher J, Bernard PH, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. Hepatology 2010;51:828-835.
34. Poynard T, Ingiliz P, Elkrief L, et al. Concordance in a world without a gold standard: a new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers. PLoS One 2008;3:e3857.
35. Roca B, Resino E, Torres V, et al. Interobserver discrepancy in liver fibrosis using transient elastography. J Viral Hepat 2012;19:711-715.
36. Perazzo H, Fernandes FF, Gomes A, et al. Interobserver variability in transient elastography analysis of patients with chronic hepatitis C. Liver Int 2014.
37. Lucidarme D, Foucher J, Le Bail B, et al. Factors of accuracy of transient elastography (fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. Hepatology 2009;49:1083-1089.

38. Myers RP, Crotty P, Pomier-Layrargues G, et al. Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy. Liver Int 2010;30:1471-1480.
39. Sagir A, Erhardt A, Schmitt M, et al. Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage. Hepatology 2008;47:592-595.
40. Arena U, Vizzutti F, Corti G, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. Hepatology 2008;47:380-384.
41. Coco B, Oliveri F, Maina AM, et al. Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases. J Viral Hepat 2007;14:360-369.
42. Arena U, Lupsor Platon M, Stasi C, et al. Liver stiffness is influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis C virus at different stages of fibrotic evolution. Hepatology 2013;58:65-72.

Table 1. Overall changes between baseline (LSM1) and follow-up (LSM2) paired liver stiffness measurements

	LSM1	LSM2	Mean absolute difference between LSM1 and LSM2	p
Fibroscan parameters				
LSM (kPa)	10.2 ± 10.0	9.7 ± 9.3	3.2 ± 6.1	0.076
IQR/M (%)	15.7 ± 6.9	15.1 ± 6.4	/	0.105
Success rate (%)	93.6 ± 10.3	94.0 ± 9.9	/	0.463
Fibrosis classes			/	0.458
Absent/mild fibrosis (< 7 kPa)	49.9	52.7		
Significant fibrosis (≥ 7 - < 9.5 kPa)	21.1	21.1		
Severe fibrosis (≥ 9.5 - < 12.5 kPa)	12.4	10.9		
Early cirrhosis (≥ 12.5 - < 20 kPa)	7.7	8.1		
Advanced cirrhosis (≥ 20 kPa)	8.9	7.2		
Senior operator (>1000 exams)	78.5	90.6	/	< 0.001
Anthropometric and biochemical variables				
Weight (kg)	72.0 ± 13.4	71.7 ± 13.0	2.5 ± 3.4	0.159
BMI (kg/m^2)	24.4 ± 3.6	24.4 ± 3.6	0.8 ± 1.1	0.171
Waist circumference (cm)	85.8 ± 11.2	84.8 ± 11.0	4.8 ± 4.9	0.053
Thoracic fold thickness (mm)	13.2 ± 7.1	13.2 ± 6.9	3.9 ± 4.9	0.584
ALT (U/l)	71.9 ± 102.9	59.9 ± 45.3	26.1 ± 75.7	0.135
Steatotest	0.36 ± 0.21	0.36 ± 0.21	0.09 ± 0.09	0.383

All data are expressed as percentage or as mean ± SD.
ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline; LSM2: liver stiffness measurement at follow-up; TE: transient elastography.

TABLE 2. Factors associated with relative variability in multivariate analyses

	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Discordance >20%	**Model 1 (age, sex, time, different operators, at least 1 non-senior operator, IQR/M and severe fibrosis)**			**Model 1 + relative changes in BMI**			**Model 1 + relative changes in WC**			**Model 1 + doubling of ALT**		
Different operators	1.49	0.96-2.29	0.074	1.49	0.92-2.44	0.108	1.34	0.82-2.20	0.245	1.72	0.97-3.03	0.064
At least 1 non-senior operator	1.24	0.80-1.92	0.338	1.38	0.82-2.34	0.226	1.19	0.69-2.05	0.533	1.66	0.94-2.93	0.083
Maximum IQR/M between LSMs	1.04	1.00-1.07	0.030	1.03	0.99-1.07	0.104	1.04	1.00-1.08	0.038	1.06	1.02-1.10	0.007
Severe fibrosis at LSM1	2.58	1.71-3.90	<0.001	3.21	1.96-5.24	<0.001	2.10	1.29-3.43	0.003	3.27	1.86-5.73	<0.001
Relative BMI changes ≥7%				2.08	1.14-3.79	0.017						
Relative WC changes ≥10%							2.09	1.21-3.59	0.008			
Doubling of ALT										3.82	1.17-12.52	0.027
Discordance > 30%	**Model 1 (age, sex, time, different operators, at least 1 non-senior operator, IQR/M and severe fibrosis)**			**Model 1 + relative changes in BMI**			**Model 1 + doubling of ALT**					
Different operators	1.45	0.91-2.31	0.123	1.41	0.83-2.38	0.204	1.70	0.92-3.14	0.094			
At least 1 non-senior operator	1.18	0.75-1.84	0.477	1.14	0.67-1.95	0.619	1.36	0.77-2.41	0.291			
Maximum IQR/M between LSMs	1.03	0.99-1.06	0.093	1.03	0.99-1.06	0.195	1.04	1.00-1.09	0.054			
Severe fibrosis at LSM1	2.35	1.56-3.53	<0.001	2.69	1.68-4.31	<0.001	2.66	1.56-4.51	<0.001			
Relative BMI changes ≥7%				1.99	1.11-3.58	0.022						
Doubling of ALT							3.27	1.18-9.05	0.023			
Discordance >50%	**Model 1 (age, sex, time, at least 1 non-senior operator and cirrhosis)**											
At least 1 non-senior operator	1.82	1.05-3.15	0.033									
Time interval between LSMs	0.92	0.85-1.00	0.046									
Cirrhosis at LSM1	2.39	1.29-4.42	0.006									

ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline; WC: waist circumference. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

TABLE 3. Factors associated with fibrosis class changes in multivariate analyses

	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
≥ 1 fibrosis class change	**Model 1 (age, sex, time, different operators, at least 1 non-senior operator, IQR/M and significant fibrosis)**			**Model 1 + Baseline BMI**			**Model 1 + Doubling of ALT**			**Model 1 + Relative SteatoTest changes**		
Different operators	1.62	0.99-2.65	0.053	1.44	0.86-	0.163	1.56	0.83-	0.168	1.65	0.61-	0.322
At least 1 non-senior operator	1.09	0.67-1.75	0.736	1.13	2.42	0.665	1.91	2.95	0.038	1.24	4.47	0.705
Maximum IQR/M between LSMs	1.03	1.00-1.07	0.060	1.02	0.66-	0.237	1.03	1.04-	0.182	1.05	0.41-	0.230
Time interval between LSMs	0.97	0.91-1.03	0.296	0.95	1.93	0.156	0.96	3.51	0.324	0.95	3.71	0.538
Significant fibrosis at LSM1	6.56	4.37-9.84	<0.001	6.40	0.99-	<0.001	6.95	0.99-	<0.001	4.20	0.97-	0.001
Baseline BMI				1.07	1.06	0.031		1.08			1.13	
Doubling of ALT					0.89-		4.24	0.88-	0.015		0.81-	
Relative SteatoTest changes ≥10%					1.02			1.05		2.83	1.12	0.036
					4.14-			4.18-			1.83-	
					9.88			11.55			9.66	
					1.01-							
					1.14			1.33-				
								13.53			1.07-	
											7.46	
≥ 2 fibrosis classes changes	**Model 1 (age, sex, time, at least 1 non-senior operator and severe fibrosis)**											
At least 1 non-senior operator	2.62	1.42-4.84	0.002									
Time interval between LSMs	0.96	0.88-1.05	0.400									
Severe fibrosis at LSM1	5.22	2.74-9.93	<0.001									

ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supporting documents to: "Clinically significant variability of elastometry on short-term follow-up in patients with chronic liver diseases"

Variability according to maximum IQR/M between paired examinations

36 paired examinations, 72.2% (26) of which performed by senior operators, had both LSMs with an IQR/M ≤10%. In this subgroup we found a discordance rate >20% in 33.3% (12), >30% in 22.2% (8) and >50% in 5.6% (2) of paired readings, resulting in 1 fibrosis class change in 25.0% (9) and ≥ 2 fibrosis class change in 2.8% (1) of paired examinations. 287 paired examinations, 75.3% (216) of which performed by senior operators, had a maximum IQR/M >10 and ≤20%. In this subgroup we found a discordance rate of >20% in 48.1% (138), >30% in 32.8% (94) and >50% in 13.6% (39) of paired readings, resulting in 1 fibrosis class change in 28.6% (82) and ≥ 2 fibrosis class change in 10.5% (30) of paired readings. 208 paired examinations, 66.3% (138) of which performed by senior operators, had a maximum IQR/M >20 and ≤30%. In this subgroup we found a discordance rate of >20% in 54.8% (114), >30% in 38.5% (80) and >50% in 11.5% (24) of paired readings, resulting in 1 fibrosis class change in 36.5% (76) and ≥ 2 fibrosis class change in 10.1% (21) of paired examinations.

We found a trend toward an association between maximum IQR/M between paired examinations and operator experience (paired readings performed by senior operators 18.66±5.69 vs. at-least one non-senior operators in paired readings 19.69±5.97, p=0.065).

Variability according to time interval between measurements

We performed a sub-analysis among 374 paired readings (70.4% of all pairs) performed at least 6 months apart. There was a statistically significant difference regarding baseline fibrosis stage among readings performed less and more than 6 months apart, patients with a shorter follow-up

having higher baseline LSM values (no/mild fibrosis 38.2% vs 54.8%, respectively; p<0.001). 276 out of 374 pairs (73.8%) were performed by senior operators (vs. 66.2% in paired readings with a less than 6 months follow-up; p:0.078) and 26.5% were performed by the same operator (vs. 44.6% in paired TE with a less than 6 months follow-up; p<0.001). In this subgroup of paired TE (TE performed ≥6 months apart) the mean absolute variation was 2.9±5.5 kPa (vs. 3.9±7.2; p:0.093) and the mean relative variation 30.0±54.8% (vs. 27.9±25.4; p:0.649). In addition, discordance >20% was found in 51.3% of paired readings (vs. 45.9%; p:0.249); >30% in 33.4% (vs. 36.3%; p:0.523); >50% in 9.4% (vs. 19.1%; p:0.002). One fibrosis class change occurred in 115 paired readings (30.7%) and ≥2 fibrosis class change in 29 paired readings (7.8% vs. 14.6%; p:0.015). Hence, at least one fibrosis class change occurred in 38.5% of patients (vs. 47.8%; p:0.048).

Supplementary Table 1. Variability in the stage of fibrosis between baseline (LSM1) and follow-up (LSM2) paired liver stiffness measurements

		LSM1					
		Absent/mild fibrosis	Significant fibrosis	Severe fibrosis	Early cirrhosis	Advanced cirrhosis	Total
LSM2	Absent/mild fibrosis	213	44	16	6	1	280
	Significant fibrosis	40	45	20	5	2	112
	Severe fibrosis	9	17	17	13	2	58
	Early cirrhosis	2	3	11	11	16	43
	Advanced cirrhosis	1	3	2	6	26	38
	Total	265	112	66	41	47	531

Supplementary Table 2. Factors associated with relative variability in univariate analyses

	Non-discordant	Discordant	OR	95% CI	p
Discordance >20%	**n: 267**	**n: 264**			
Different operators	165 (61.8)	197 (74.6)	1.82	1.25-2.64	0.002
At least 1 non-senior operator	64 (24.0)	87 (33.0)	1.56	1.07-2.28	0.022
Maximum IQR/M between LSMs	18.29±5.75	19.63±5.75	1.04	1.01-1.07	0.008
Significant fibrosis at LSM1	113 (42.3)	153 (58.0)	1.88	1.33-2.65	<0.001
Severe fibrosis at LSM1	53 (19.9)	101 (38.3)	2.50	1.69-3.70	<0.001
Cirrhosis at LSM1	30 (11.2)	58 (22.0)	2.22	1.38-3.59	0.001
Absolute BMI changes (kg/m^2)	0.67±0.85	1.01±1.33	1.35	1.10-1.65	0.003
Relative BMI changes ≥7%	21 (10.3)	38 (18.3)	1.94	1.09-3.43	0.022
Absolute WC changes (cm)	4.35±4.42	5.35±5.37	1.04	1.00-1.09	0.044
Relative WC changes ≥10%	27 (13.7)	48 (25.3)	2.13	1.26-3.59	0.004
Doubling of ALT	4 (2.3)	14 (8.3)	3.88	1.25-12.05	0.015
Discordance > 30%	**n: 349**	**n: 182**			
Different operators	226 (64.8)	136 (74.7)	1.61	1.08-2.40	0.019
At least 1 non-senior operator	89 (25.5)	62 (34.1)	1.51	1.02-2.23	0.038
Maximum IQR/M between LSMs	18.55±5.72	19.73±5.84	1.04	1.00-1.07	0.026
Significant fibrosis at LSM1	156 (44.7)	110 (60.4)	1.89	1.31-2.72	0.001
Severe fibrosis at LSM1	79 (22.6)	75 (41.2)	2.40	1.63-3.53	<0.001
Cirrhosis at LSM1	43 (12.3)	45 (24.7)	2.34	1.47-3.72	<0.001
Relative BMI changes ≥7%	32 (11.7)	27 (19.7)	1.86	1.06-3.25	0.029
Doubling of ALT	7 (3.0)	11 (9.6)	3.37	1.27-8.94	0.018
Discordance >50%	**n: 466**	**n: 65**			
At least 1 non-senior operator	123 (26.4)	28 (43.1)	2.11	1.24-3.59	0.005
Time interval between LSMs (months)	7.98±3.26	6.62±3.80	0.89	0.83-0.96	0.002
Severe fibrosis at LSM1	126 (27.0)	28 (43.1)	2.04	1.20-3.48	0.008
Cirrhosis at LSM1	67 (14.4)	21 (32.3)	2.84	1.59-5.08	<0.001

All data are expressed as frequency and percentage or as mean ± SD.
ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline; WC: waist circumference. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

Supplementary Table 3. Factors associated with fibrosis class changes in univariate analyses

	Non-discordant	Discordant	OR	95% CI	p
≥ 1 fibrosis class change	**n: 312**	**n: 219**			
Different operators	201 (64.4)	161 (73.5)	1.53	1.05-2.24	0.027
At least 1 non-senior operator	77 (24.7)	74 (33.8)	1.56	1.07-2.28	0.022
Maximum IQR/M between LSMs	18.39±5.63	19.76±5.91	1.04	1.01-1.07	0.008
Time interval between LSMs (months)	8.11±3.24	7.39±3.48	0.94	0.89-0.99	0.015
Significant fibrosis at LSM1	99 (31.7)	167 (76.3)	6.91	4.67-10.23	<0.001
Severe fibrosis at LSM1	54 (17.3)	100 (45.7)	4.02	2.70-5.97	<0.001
Cirrhosis at LSM1	37 (11.9)	51 (23.3)	2.26	1.42-3.59	<0.001
Baseline BMI (kg/m^2)	23.98±3.52	24.96±3.70	1.08	1.02-1.14	0.005
Doubling of ALT	5 (2.4)	13 (9.4)	4.15	1.44-11.91	0.005
Relative SteatoTest changes ≥10%	58 (65.2)	37 (82.2)	2.47	1.03-5.96	0.040
≥ 2 fibrosis classes changes	**n: 479**	**n: 52**			
At least 1 non-senior operator	124 (25.9)	27 (51.9)	3.09	1.73-5.53	<0.001
Time interval between LSMs (months)	7.94±3.31	6.63±3.57	0.90	0.83-0.97	0.008
Significant fibrosis at LSM1	226 (47.2)	40 (76.9)	3.73	1.91-7.29	<0.001
Severe fibrosis at LSM1	120 (25.1)	34 (65.4)	5.65	3.08-10.38	<0.001
Cirrhosis at LSM1	72 (15.0)	16 (30.8)	2.51	1.33-4.77	0.004

All data are expressed as frequency and percentage or as mean ± SD.
ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

Supplementary Table 4. Factors associated with variability and fibrosis class changes in paired examinations without significant modifications of BMI

	Non-discordant	Discordant	OR	95% CI	p
Discordance >20%	**n: 163**	**n: 149**			
Different operators	100 (61.3)	113 (75.8)	1.98	1.21-3.23	0.006
At least 1 non-senior operator	31 (19.0)	41 (27.5)	1.62	0.95-2.75	0.075
Significant fibrosis at LSM1	70 (42.9)	85 (57.0)	1.77	1.13-2.76	0.013
Severe fibrosis at LSM1	29 (17.8)	58 (38.9)	2.95	1.75-4.95	<0.001
Cirrhosis at LSM1	13 (8.0)	31 (20.8)	3.03	1.52-6.05	0.001
Relative WC changes ≥10%	15 (10.1)	26 (19.7)	2.18	1.10-4.31	0.024
Doubling of ALT	4 (3.4)	11 (11.2)	3.64	1.12-11.80	0.031
Discordance > 30%	**n: 214**	**n: 98**			
Significant fibrosis at LSM1	98 (45.8)	57 (58.2)	1.65	1.02-2.67	0.043
Severe fibrosis at LSM1	48 (22.4)	39 (39.8)	2.29	1.36-3.83	0.001
Cirrhosis at LSM1	22 (10.3)	22 (22.4)	2.53	1.32-4.83	0.004
Doubling of ALT	6 (4.0)	9 (13.2)	3.64	1.24-10.67	0.020
Discordance >50%	**n: 279**	**n: 33**			
Cirrhosis at LSM1	35 (12.5)	9 (27.3)	2.61	1.12-6.08	0.032
≥ 1 fibrosis class change	**n: 185**	**n: 127**			
Time interval between LSMs (months)	8.33±2.92	7.17±3.36	0.89	0.83-0.96	0.002
Significant fibrosis at LSM1	59 (31.9)	96 (75.6)	6.61	3.97-11.01	<0.001
Severe fibrosis at LSM1	28 (15.1)	59 (46.5)	4.87	2.86-8.28	<0.001
Cirrhosis at LSM1	16 (8.6)	28 (22.0)	2.99	1.54-5.79	0.001
Doubling of ALT	3 (2.3)	12 (14.3)	7.22	1.97-26.43	0.001
Relative SteatoTest changes ≥10%	41 (61.2)	28 (82.4)	2.96	1.08-8.12	0.041
≥ 2 fibrosis classes changes	**n: 286**	**n: 26**			
Significant fibrosis at LSM1	136 (47.6)	19 (73.1)	2.99	1.22-7.34	0.013
Severe fibrosis at LSM1	71 (24.8)	16 (61.5)	4.85	2.10-11.16	<0.001

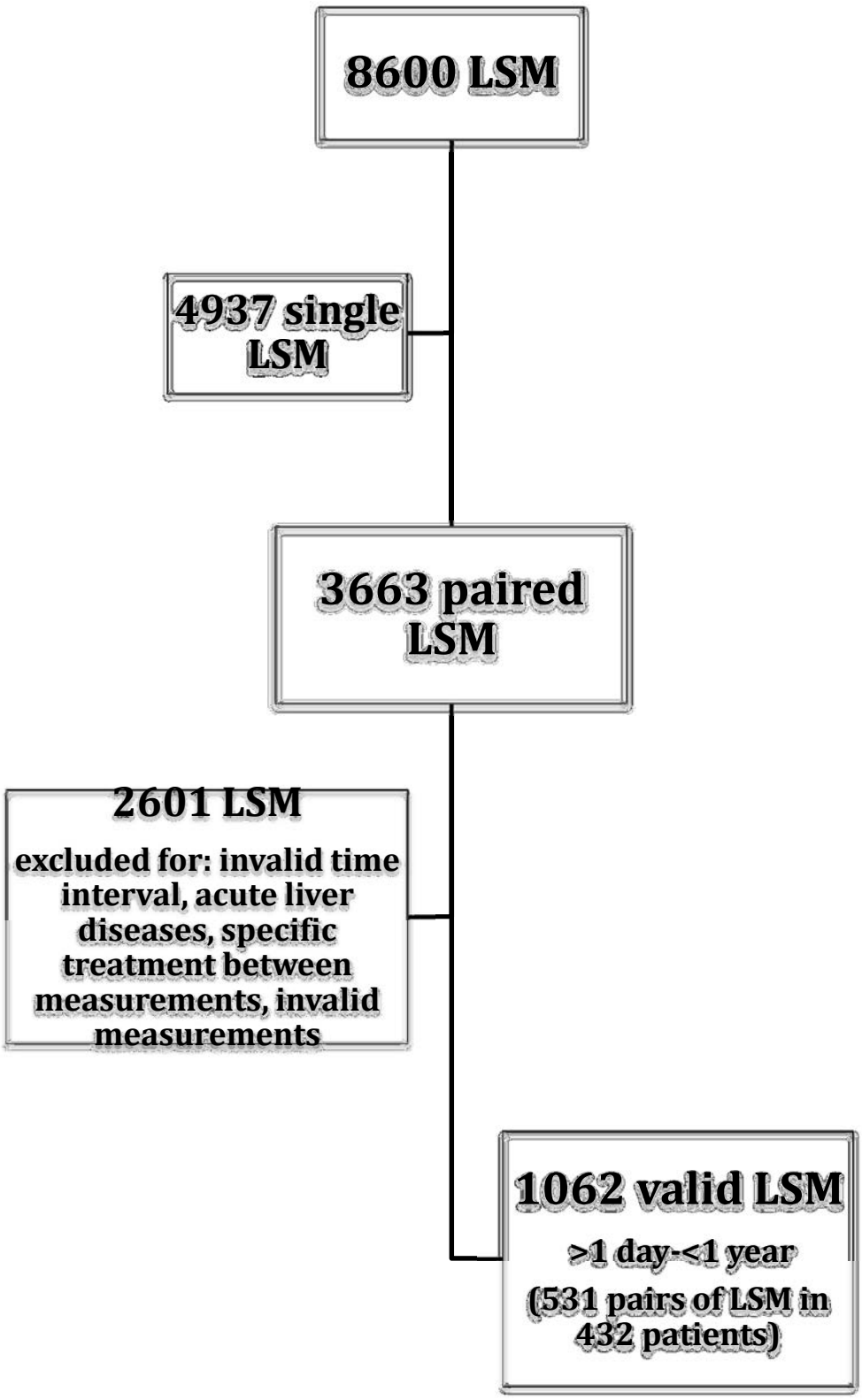
All data are expressed as frequency and percentage or as mean ± SD.
ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; LSM1: liver stiffness measurement at baseline; WC: waist circumference. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

Supplementary Table 5. Factors associated with variability and fibrosis class changes in paired examinations performed by the same operator

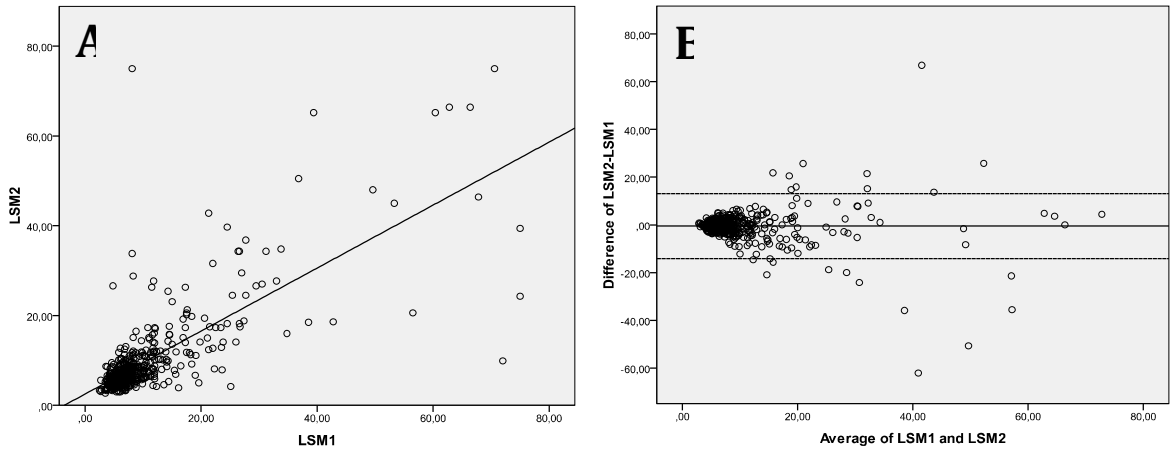
	Non-discordant	Discordant	OR	95% CI	p
Discordance >20%	**n: 102**	**n: 67**			
Maximum IQR/M between LSMs	17.20±5.17	20.10±6.12	1.10	1.04-1.16	0.002
Severe fibrosis at LSM1	20 (19.6)	23 (34.3)	2.14	1.06-4.33	0.032
Absolute BMI changes (kg/m^2)	0.55±0.68	1.06±1.65	1.53	1.04-2.25	0.032
Relative BMI changes ≥7%	5 (6.6)	9 (17.6)	3.04	0.96-9.69	0.051
Doubling of ALT	1 (1.5)	4 (11.1)	8.25	0.89-76.85	0.049
Discordance > 30%	**n: 123**	**n: 46**			
Maximum IQR/M between LSMs	17.61±5.37	20.33±6.23	1.09	1.02-1.16	0.007
Doubling of ALT	1 (1.3)	4 (16.7)	15.60	1.65-147.37	0.010
Discordance >50%	**n: 153**	**n: 16**			
Cirrhosis at LSM1	23 (15.0)	6 (37.5)	3.39	1.12-10.24	0.035
≥ 1 fibrosis class change	**n: 111**	**n: 58**			
Maximum IQR/M between LSMs	17.32±5.30	20.31±6.05	1.10	1.04-1.17	0.002
Significant fibrosis at LSM1	36 (32.4)	45 (77.6)	7.21	3.46-15.03	<0.001
Severe fibrosis at LSM1	18 (16.2)	25 (43.1)	3.91	1.90-8.08	<0.001
Cirrhosis at LSM1	14 (12.6)	15 (25.9)	2.42	1.07-5.44	0.030
Doubling of ALT	0 (0.0)	5 (15.2)	-	-	0.003
≥ 2 fibrosis classes changes	**n: 155**	**n: 14**			
Severe fibrosis at LSM1	35 (22.6)	8 (57.1)	4.57	1.49-14.06	0.009

All data are expressed as frequency and percentage or as mean ± SD.
ALT: alanine aminotransferases; BMI: body mass index; IQR/M: interquartile range and median LSM value ratio; LSM1: liver stiffness measurement at baseline. Significant fibrosis was defined as ≥ 7 kPa; severe fibrosis as ≥ 9.5 kPa; cirrhosis as ≥ 12.5 kPa.

Supplementary Figure 1. Flow chart representing the paired liver stiffness measurements (LSM) selection process

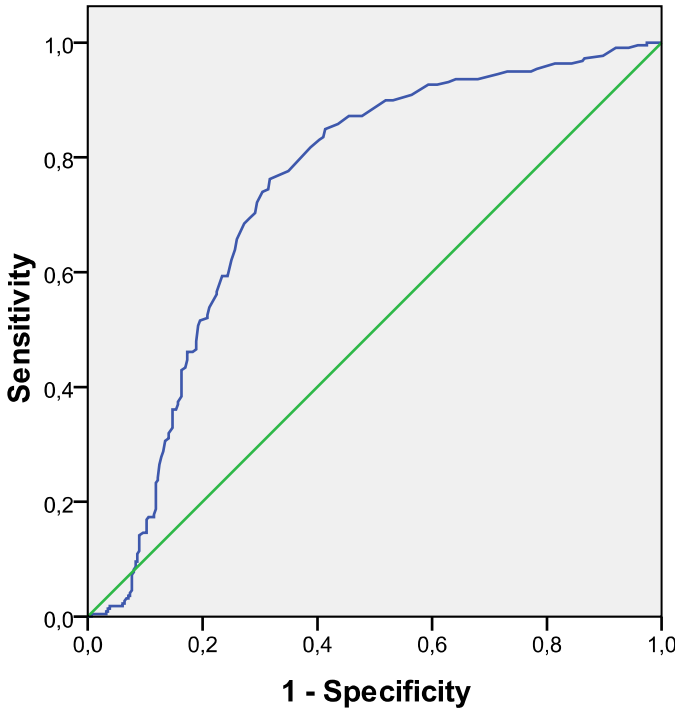


Supplementary Figure 2. Correlation between baseline (LSM1) and follow-up (LSM2) paired liver stiffness measurements.



A. Scatter plot representing the correlation between baseline (LSM1) and follow-up (LSM2) paired liver stiffness measurements. **B.** Bland-Altman plot representing the relationship between the mean liver stiffness measurement for each pair of examinations [(LSM1+LSM2)/2] and the difference between baseline and follow-up paired readings (LSM2-LSM1). The solid line is at the mean of difference and the dashed lines are at ± 1.96 SD.

Supplementary Figure 3. ROC curve of baseline liver stiffness measurement (LSM1) and at least one fibrosis class change between paired liver stiffness measurements.



ROC curve representing the predictive performance of the baseline liver stiffness measurement (LSM1) for at least one fibrosis class change between paired liver stiffness measurements. AUC 0.740, p<0.001. Best cut-off point: LSM1 7.15 kPa, sensitivity 74% and specificity 70%.

VI-3. Discussion de l'article 2.

Cette étude a montré une variabilité significative des mesures successives d'élastométrie qui n'est pas liée à la progression ou à la régression de la fibrose hépatique. Cette découverte met en évidence les limites de l'élastographie utilisée comme seule méthode de suivi de la fibrose chez les patients atteints d'hépatopathie chronique. Nous avons également identifié certains facteurs qui devraient inciter à la prudence dans l'interprétation des résultats d'élastométrie.

Nous avons observé chez la moitié des patients les changements relatifs des mesures successives d'élastographie de plus de 20% et dans un tiers des cas, de plus de 30%. Cette variabilité des mesures d'élastographie a été observée tout au long du spectre des valeurs d'élastométrie. Ceci suggère que la variabilité de la rigidité tissulaire hépatique (soit pour des raisons biologiques soit en raison de méthodes de mesure analytiques) est un phénomène général survenant à tous les stades de fibrose et non limitée aux patients atteints de fibrose avancée.

Les résultats de cette étude montrent que les patients avec une valeur d'élastographie <6,5 kPa avaient une prévalence significativement plus faible de changement de classe de fibrose par rapport à l'évaluation ultérieure que les patients avec une valeur d'élastographie > 6,5 kPa. Chez les patients atteints de fibrose significative ou avancée (FibroScan à la première mesure >7kPa), la probabilité que ceci peut être expliqué par la variabilité intrinsèque des mesures d'élastométrie est beaucoup plus élevé. L'analyse uni- et multi-variée renforcent cette conclusion en identifiant la fibrose significative au moment de la première évaluation par l'élastographie comme un facteur de variabilité importante à court terme sur une évaluation ultérieure.

Nous avons identifié certains facteurs qui déterminent la variabilité importante des valeurs d'élastographie indépendamment de changements réels de stade de fibrose hépatique. Un de ces facteurs était la dépendance vis-à-vis de l'opérateur. Nous avons trouvé que l'évaluation par les différents opérateurs et/ou des opérateurs moins expérimentés était un facteur prédictif majeur de la variabilité des mesures d'élastographie. En limitant l'analyse au même opérateur expérimenté en quelque sorte réduit la variabilité (un changement d'une classe dans un quart des patients seulement).

Le ratio IQR/Médiane a déjà été défini comme un important facteur prédictif de variabilité des mesures d'élastographie. Nos données montrent que plus le ratio IQR/M est faible, plus la variabilité l'est également; ceci confirme l'importance de la mesure de la

dispersion des résultats pour une évaluation correcte des résultats de l'élastométrie, y compris pour l'évaluation longitudinale.

Parmi les facteurs liés au patient, l'IMC a été associé de manière systématique à la discordance des examens successifs. La majoration des scores d'élasticité en cas de flaire d'ALT été déjà décrite par d'autres études (Coco, Oliveri et al. 2007; Arena, Vizzutti et al. 2008; Sagir, Erhardt et al. 2008; Arena, Lupsor Platon et al. 2013). Nos données montrent que même une faible élévation du taux d'ALT (deux fois la normale) a un impact non-négligeable sur la capacité diagnostique de l'élastographie.

Cette étude a plusieurs points forts. Elle a été réalisée dans une large cohorte de patients atteints de diverses maladies chroniques du foie ce qui assure la représentativité et généralisabilité des résultats. Nos résultats représentent des analyses approfondies sur la discordance possible entre les mesures d'élastographie au cours du suivi à la fois exprimés en terme de variabilité absolue et relative et de changements de classe de fibrose. Les facteurs profibrotiques confondants, ainsi que les facteurs confondants connus de rigidité hépatique ont été pris en compte dans les analyses.

Cette étude présente aussi certaines limitations. Il s'agit d'une étude rétrospective sans données histologiques pouvant confirmer l'absence de progression ou de régression de la fibrose pendant la courte période de l'étude. Nous n'avons étudié que la sonde M d'élastographie, et nos résultats ne peuvent s'extrapoler à la sonde XL sans étude spécifique, qui reste à envisager. La majorité des patients étaient à jeun lors de la mesure de l'élastométrie mais pas tous. En effet ça n'est que très récemment que le rôle confondant du repas sur la mesure de la rigidité hépatique a été documenté.

En conclusion, nos données montrent qu'il existe une grande variabilité intrinsèque des mesures successives d'élastométrie indépendantes de l'évolution de la fibrose. En particulier, la variabilité est plus élevée chez les patients avec un résultat d'élastographie > 7 kPa et chez ceux dont les examens ont été réalisés par différents opérateurs. Les variations des mesures successives d'élastométrie doivent être interprétées avec prudence et doivent prendre en compte les changements d'IMC et d'ALAT entre les examens en plus des valeurs IQR/Médiane de chaque examen. Les changements de classe de fibrose sont plus robustes que les différences absolues ou relatives entre les valeurs des examens successifs. Cette étude montre les limites de l'élastométrie dans le suivi longitudinal de la fibrose hépatique et suggère fortement que chez les malades atteints d'hépatopathie chronique, ce suivi devrait au mieux s'appuyer sur une méthode additionnelle d'évaluation de la fibrose.

Chapitre VII.

***Article 3*: "Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease".**

VII-1. Objectifs du travail

La NAFLD est une des principales causes de maladie chronique du foie et pourrait devenir un important problème de santé en raison de la morbidité et la mortalité hépatique et extra-hépatique.

Plusieurs marqueurs non-invasifs de stéatose hépatique sont disponibles avec une validation indépendante limitée. Notre objectif était de déterminer la performance diagnostique et les limites de 5 marqueurs non-invasifs (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI et TyG) et leur capacité de prédire le taux de stéatose hépatique dans une grande cohorte de 324 patients atteint d'une NAFLD histologiquement prouvée.

Une échographie abdominale est largement utilisée en pratique clinique pour le diagnostic de stéatose hépatique, mais le seuil de détectabilité est la présence de stéatose dans 20-30% des hépatocytes (Palmentieri, de Sio et al. 2006) (Dasarathy, Dasarathy et al. 2009). La spectroscopie de résonance magnétique est une méthode d'imagerie très performante mais le coût et la disponibilité limitent son utilisation dans la pratique clinique. La biopsie hépatique reste une méthode de référence, mais c'est une procédure invasive et coûteuse, qui ne convient pas pour le dépistage et le suivi. Par conséquent, il y a un intérêt considérable dans le développement de méthodes non invasives, simple, peu couteux et performants pour le dépistage précoce et la quantification de la stéatose dans le cadre du dépistage, le suivi et l'évaluation d'efficacité de traitement.

Nous avons réalisé une analyse rétrospective de notre base de données des biopsies hépatiques faites entre 2000 et 2010 et nous avons identifié les patients atteints d'une NAFLD histologiquement prouvée. Les patients avec d'autres causes d'hépatopathie chronique (la consommation d'alcool >30g/j pour l'homme et >20 g/j pour une femme, l'hépatite B ou C, l'hépatite auto-immune) ont été exclus.

Les données cliniques, anthropométriques, biologiques et d'échographie abdominale ont été collectées dans une période de 6 mois de la date de la biopsie. Tous les patients inclus

ont eu une biopsie hépatique percutanée et les lames de biopsie ont été lues par un seul anatomopathologiste. La stéatose hépatique a été identifiée en quatre catégories : absente (<5%), minime (≥5-33%), modérée (>33-66%) et sévère (>66%). La NASH a été définie par la présence d'au moins 5% de stéatose et au moins de grade 1 de ballonnisation hépatocellulaire et l'inflammation lobulaire.

Nous avons choisi cinq marqueurs non-invasifs. *Fatty Liver Index* est un marqueur de stéatose, qui a été développé dans une population générale et il a été validé versus l'échographie abdominale (Bedogni, Bellentani et al. 2006). *NAFLD Liver Fat Score* est un marquer de stéatose qui a été validé versus la spectroscopie de résonance magnétique (Kotronen, Peltonen et al. 2009). *Hepatic steatosis index* est un simple marqueur pour prédire la NAFLD et il a été développé dans une étude transversale avec plus de 10000 sujets inclus et il a été validé versus l'échographie abdominale (Lee, Kim et al. 2010). *The Visceral Adiposity Index* (VAI) est un marqueur d'adiposité viscérale (Petta, Amato et al. 2010) et *Triglycerides x Glucose (TyG) index* est un score d'insulinorésistance, sa corrélation à la stéatose hépatique a été démontré chez les patients infectés par le virus de l'hépatite C (Guerrero-Romero, Simental-Mendia et al. 2010).

Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Short title: Biomarkers of steatosis in NAFLD

Larysa Fedchuk,[1] Fabio Nascimbeni,[1,2] Raluca Pais,[1] Frederic Charlotte,[3] Chantal Housset,[4] Vlad Ratziu,[1] for the LIDO Study Group

AFFILIATIONS:

[1] Department of Hepatology and Gastroenterology, Pitié Salpêtrière Hospital, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; [2] Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy; [3] Department of Pathology, Pitié Salpêtrière Hospital, University Pierre et Marie Curie, Paris, France; [4] Saint-Antoine Research Centre, University Pierre et Marie Curie, Paris, France

CORRESPONDING AUTHOR:

Vlad Ratziu

Address: Hôpital Pitié Salpêtrière, Service d'Hépatogastroentérologie, 47-83 Bd de l'Hopital, Paris 75013, France.

E-mail: vlad.ratziu@upmc.fr

Fax: +33 1 42 16 14 27

FINANCIAL SUPPORT: The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° HEALTH-F2-2009-241762 for the project FLIP.

COMPETING INTERESTS: The authors declare no conflicts of interest for the topic presented in this article

EWC (text only): 4476

LIST OF ABBREVIATIONS:

NAFLD - Non-alcoholic fatty liver disease; FLI - Fatty Liver Index; HSI - Hepatic Steatosis Index; NAFLD-LFS - NAFLD liver fat score; VAI - Visceral Adiposity Index; TyG -Triglycerides x Glucose index; WC - waist circumference; BMI - Body mass index; HDLc - high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR - homeostatic model assessment of insulin resistance; BP - blood pressure; NASH - non-alcoholic steatohepatitis; SD - standard deviation; IQR - interquartile range; ANOVA - analysis of variance; ROC - Receiver operating characteristic; AUROCs - areas under the ROC; PPV -positive predictive value; NPV - negative predictive value; LR - likelihood ratio.

KEYWORDS:

Fatty Liver Index; Hepatic Steatosis Index; NAFLD liver fat score; Visceral Adiposity Index; Triglycerides x Glucose Index; non-alcoholic steatohepatitis; liver fibrosis; insulin resistance

ABSTRACT

Introduction. Several steatosis biomarkers (SbM) are available with limited independent validation. We aimed to determine diagnostic value and limitations of several SbM using liver biopsy as reference standard in a large cohort of patients with suspected NAFLD.

Methods. 324 consecutive liver biopsies were included. Histological steatosis was categorized as none(<5%), mild(5-33%), moderate(33-66%) and severe(>66%). Five SbM were measured: fatty liver index (FLI), NAFLD liver fat score (NAFLD-LFS), hepatic steatosis index (HSI), visceral adiposity index (VAI) and triglycerideXglucose (TyG) index.

Results. Steatosis grades prevalence was: none 5%, mild 39%, moderate 30% and severe 27%. Except for VAI, the SbM showed a linear trend across the steatosis grades. However, their correlation with the histological amount of steatosis was only weak-moderate. All SbM had an adequate diagnostic accuracy for the presence of steatosis: AUROCs for FLI, LFS, HSI, VAI, and TyG were 0.83, 0.80, 0.81, 0.92, and 0.90. However, their ability to quantify steatosis was poor: none of them distinguished between moderate and severe steatosis and the AUROCs for predicting steatosis>33% were 0.65, 0.72, 0.65, 0.59, and 0.59 for FLI, LFS, HSI, VAI, and TyG. Both fibrosis and inflammation significantly confounded the association between SbM and steatosis. The SbM were all correlated with HOMA-IR, independent from histological steatosis.

Conclusion. All five SbM can diagnose steatosis and are correlated with insulin resistance but are confounded by fibrosis and inflammation and do not accurately quantify steatosis. This may limit their clinical utility. More research is needed to identify truly independent and quantitative markers of steatosis **(EWC:250).**

STUDY HIGHLIGHTS:

1. WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE
    - Non-alcoholic fatty liver disease is an important health concern, requiring non-invasive screening and monitoring strategies.
    - Several non-commercial steatosis biomarkers based on aggregate scores from different anthropometric and metabolic parameters are available.
    - Performances and limitations of such steatosis biomarkers are insufficiently characterized.

2. WHAT IS NEW HERE
    - In patients with suspected NAFLD these steatosis biomarkers performed satisfactorily for the prediction of histological steatosis and were correlated with insulin resistance.
    - However their correlation with the amount of steatosis was poor and therefore they were of limited value for quantification of steatosis. Besides, necroinflammation and advanced fibrosis significantly confounded the relationship with steatosis.
    - The clinical utility of the steatosis biomarkers is limited to the detection of steatosis; truly independent and quantitative markers of liver steatosis are needed.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), has an estimated prevalence of 20 to 30% in the general population and still higher in individuals with metabolic risk factors(Machado, Marques-Vidal et al. 2006; Targher, Bertolini et al. 2007; Williams, Stengel et al. 2011). It is currently a leading cause of chronic liver disease and could become an important health concern because of associated hepatic and extrahepatic morbidity and mortality.(Musso, Gambino et al. 2011; Armstrong, Adams et al. 2014)

Liver ultrasonography, a largely available procedure for first-line fatty liver detection in clinical practice, has a low sensitivity as it only detects steatosis when present in more than 20-30% of hepatocytes.(Palmentieri, de Sio et al. 2006; Dasarathy, Dasarathy et al. 2009) Besides, it cannot reliably quantify steatosis, an important drawback for the ability to monitor dietary and pharmacological interventions. Magnetic resonance spectroscopy is a highly sensitive and quantitative imaging procedure but cost and availability severely restrict its use in clinical practice. Liver biopsy is therefore still the most sensitive tool for diagnosing and monitoring changes in liver fat. Nevertheless, it is an invasive and costly procedure not suitable for screening or monitoring. Hence, there is a considerable interest in developing non-invasive, simple, accurate and cost-effective methods for early identification and quantification of steatosis in the setting of screening, follow-up and evaluation of treatment.

Several non-commercial steatosis biomarkers based on aggregate scores from different anthropometric and metabolic parameters have been published.(Bedogni, Bellentani et al. 2006; Kotronen, Peltonen et al. 2009; Lee, Kim et al. 2010; Machado and Cortez-Pinto 2013) Independent validation of these steatosis biomarkers is very scarce. Because of substantial heterogeneity in the types of patients included such an independent validation is critical before recommending these tests for wider clinical practice or research purposes. The Fatty Liver Index (FLI) has shown good performance in detecting fatty liver in several population studies, however it has only been validated against liver ultrasonography.(Bedogni, Bellentani et al. 2006; Gastaldelli, Kozakova et al. 2009; Calori, Lattuada et al. 2011; Kim, Kwon et al. 2011) The hepatic steatosis index (HSI), derived from data of a Korean cross-sectional case-control study involving more than 10000 patients, is a simple and promising score for predicting NAFLD, but it has been validated against ultrasound and lacks external validation.(Lee, Kim et al. 2010) The NAFLD liver fat score (NAFLD-LFS) has been validated against magnetic resonance spectroscopy showing an overall good accuracy in diagnosing NAFLD, however it has limited external validation.(Kotronen, Peltonen et al. 2009; Wlazlo, van Greevenbroek et al. 2012)

The Visceral Adiposity Index (VAI), a surrogate biomarker of visceral adiposity,(Amato, Giordano et al. 2010) and the Triglycerides x Glucose (TyG) index,(Guerrero-Romero, Simental-Mendia et al. 2010) an indirect score of insulin resistance, have been both demonstrated to be independently associated with histologically defined steatosis in patients with chronic hepatitis C.(Petta, Amato et al. 2010; Petta, Di Marco et al. 2011) However, whether VAI predicts liver histology in patients with NAFLD is controversial and, to our knowledge, TyG index has never been specifically investigated in NAFLD.(Musso, Cassader et al. 2012; Petta, Amato et al. 2012; Vongsuvanh, George et al. 2012)

In this study we aimed to determine the diagnostic performance of the five above-mentioned biomarkers (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI and TyG), including their ability to quantitatively predict the amount of steatosis, in a large cohort of biopsy-proven NAFLD patients.

PATIENTS AND METHODS

Study population and measurements

We retrospectively analyzed 324 consecutive liver biopsies performed between 2000 and 2010 for clinical and/or ultrasonographic suspicion of NAFLD. Exclusion criteria were: alcohol consumption ≥30 g/day in men or ≥20 g/day in women, presence of hepatitis B surface antigen or anti-hepatitis C virus antibodies, genetic hemochromatosis, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, alpha1-antitrypsin deficiency, Wilson's disease, drug-induced liver disease, cardiac insufficiency or any other chronic liver disease that could coexist in addition to NAFLD. Patients taking medications that can induce secondary NASH (corticosteroids, amiodarone, tamoxifen) were not included.

Clinical, anthropometric, laboratory and ultrasonographic data were collected within a 6 month time-period from the date of liver biopsy. A complete medical history and physical examination was undertaken in all patients. All patients underwent measurements of blood pressure, weight, height, and waist circumference (WC) according to uniform protocols. Body mass index (BMI) was calculated using the standard formula: weight (in kilograms)/height^2 (in meters^2). Laboratory evaluation included routine liver biochemistry, lipid profile (total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc), and total triglycerides), fasting glucose and insulin. The degree of insulin resistance was determined by the homeostatic model assessment (HOMA-IR) using the formula: (insulin x glucose)/22.5.(Matthews, Hosker et al. 1985) Liver ultrasonography data for the assessment of hepatic steatosis (bright liver pattern with liver/kidney gradient) were also retrieved.

The metabolic syndrome was defined according to criteria of the International Diabetes Federation (Alberti, Zimmet et al. 2005): central obesity (waist circumference **≥** 94 cm in men and **≥** 80 cm in women) and at least 2 other metabolic alterations among serum triglycerides **≥** 1.70 mmol/L or specific treatment for hypertriglyceridemia, serum HDLc **<**1.03 mmol/L in men and **<**1.29 mmol/L in women or specific treatment for this lipid abnormality, systolic blood pressure (BP) **≥** 130 mmHg or diastolic BP **≥** 85 mmHg or treatment for previously diagnosed hypertension, and fasting plasma glucose **≥** 5.6 mmol/L or previously diagnosed type 2 diabetes.

Histological assessment

Liver biopsies were performed percutaneously under ultrasound guidance. All liver biopsies were adequate in terms of length, absence of fragmentation and quality of staining. Liver biopsies were routinely formalin-fixed, paraffin-embedded and Hematoxylin & Eosin and Picrosirius Hemalun stained. All slides were read by a single expert liver pathologist (F.C.), blinded to clinical data, and categorized using the scoring system proposed by Kleiner et al.(Kleiner, Brunt et al. 2005) Steatosis was categorized as none if the presence of steatosis was less than 5%, mild (≥5-33%), moderate (>33-66%) and severe (>66%). We defined non-alcoholic steatohepatitis (NASH) as the presence of at least 5% of steatosis with at least both grade 1 hepatocellular ballooning and lobular inflammation following a mainly centrilobular pattern of distribution. Mild fibrosis was defined as F0-F2 and advanced fibrosis as F3-F4 (i.e. bridging fibrosis and cirrhosis). Advanced NASH was empirically defined as the simultaneous presence of moderate/severe steatosis (>33%), NASH and advanced fibrosis.

Surrogate markers of liver steatosis

Five steatosis biomarkers, Fatty Liver Index (FLI), NAFLD liver fat score (NAFLD-LFS), Hepatic Steatosis Index (HSI), Visceral Adiposity Index (VAI) and triglycerides and glucose (TyG) index, were calculated using the clinical, anthropometric and laboratory data retrieved at the time of each liver biopsy, according to the following formulas.

FLI: $[e^{0.953*\log e(\text{triglycerides}) + 0.139*\text{BMI} + 0.718*\log e(\text{GGT}) + 0.053*\text{WC} - 15.745}] / [1 + e^{0.953*\log e(\text{triglycerides}) + 0.139*\text{BMI} + 0.718*\log e(\text{GGT}) + 0.053*\text{WC} - 15.745}] * 100$.(Bedogni, Bellentani et al. 2006)

NAFLD-LFS: - 2.89 + 1.18 * metabolic syndrome (yes =1/no=0) + 0.45 * type 2 diabetes (yes= 2/no=0) + 0.15 * insulin (mU/L) + 0.04 * AST(U/L) - 0.94 * AST/ALT.(Kotronen, Peltonen et al. 2009)

HSI: 8 * ALT/AST + BMI (+ 2, if type 2 diabetes; +2, if female).(Lee, Kim et al. 2010)

VAI: [WC / 39.68 + (1.88 * BMI)] * (triglycerides / 1.03) * (1.31 / HDL), for males; [WC / 36.58 + (1.89 * BMI)] * (triglycerides / 0.81) * (1.52 / HDL), for females.(Petta, Amato et al. 2010)

TyG index: Log[(triglycerides) (mg/dl) x glucose (mg/dl)/2].(Guerrero-Romero, Simental-Mendia et al. 2010)

Statistical analysis

In descriptive analyses, continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) or as median with interquartile range [IQR], as appropriate and categorical variables as frequency and percentage. Numerical variables were compared using the Student's t-test for those that were normally distributed, and the Mann-Whitney U test for those without normal distribution. The chi-square and Fisher's exact tests were used for qualitative data when appropriate.

Analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc analysis and trend analysis was used to assess the differences in liver steatosis markers values according to the histological steatosis grade. The correlation between the fatty liver biomarkers and the histological amount of liver steatosis was assessed with the Spearman's rank test. Pearson's coefficient was used to investigate the correlation between the steatosis biomarkers and insulin resistance as assessed with HOMA-IR. Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed to investigate the accuracy of the five non-invasive biomarkers (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI and TyG index) for estimating the presence of any steatosis (>5%), moderate/severe steatosis (>33%), NASH and advanced NASH using liver biopsy as the gold standard. The areas under the ROC (AUROCs) curves with 95% CI were recorded. Only for steatosis >5% and >33%, sensibility, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and likelihood ratio (LR) were calculated after the identification of the optimal cut-off point for each ROC curve using the Youden index. Multiple linear regression analyses were performed to evaluate the confounding effect of fibrosis and necroinflammation (ballooning and lobular inflammation) in the association between histologically-assessed liver steatosis and its biomarkers. Moreover, we used linear regression to evaluate the association between the steatosis biomarkers, histological grades of steatosis and insulin resistance as assessed with HOMA-IR.

Two-sided p-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using Number Cruncher Statistical Systems 2008 (NCSS; Kaysville; UT, USA).

RESULTS

Study population and overall characteristics

Table 1 summarizes the baseline features (clinical, laboratory, and liver biopsy data) of the study population. The majority of patients were male (64%) and the mean age was 52.6±11.43 years. Mean BMI was 29.7 ± 5.35 kg/m^2. Metabolic alterations were common and the full-blown metabolic syndrome was present in half of the cases. 241 out of 296 patients (81%) had a liver ultrasound showing a bright liver pattern which was diagnostic of fatty liver. With regard to liver histology, only 5% of patients did not have steatosis, mild steatosis was detected in 39% and moderate/severe steatosis in the remaining 57% of cases. 171 patients (53%) had NASH, 76 patients (24%) had advanced fibrosis (stage 3-4) and 38 (12%) had advanced NASH on liver biopsy.

Mean values of steatosis markers were high: FLI 74 ± 23, NAFLD-LFS 1.3 ± 2.8, HSI 43.3 ± 6.9, VAI 3.0 ± 5.1, and TyG 8.9 ± 0.7.

Fig. 1 shows the distribution of the five biomarkers according to the histological grades of steatosis. Except for VAI (ANOVA for trend, p:0.065), the surrogate markers of steatosis showed a linear trend across the histological grades of steatosis (ANOVA for trend, p<0.001 for FLI, NAFLD-LFS, HSI and TyG index). However, their correlation with the histological amount of liver steatosis assessed as a continuous variable was only weak to moderate (Spearman's rho: 0.280 for FLI; 0.424 for NAFLD-LFS; 0.300 for HSI; 0.214 for VAI and 0.193 for TyG index).

Diagnostic accuracy of steatosis markers for the detection of steatosis

The majority of indexes had significantly higher mean values in mild than in no steatosis grades (5-33% vs. 0-5%): FLI 70±22 vs. 43±25, respectively, p<0.001; NAFLD-LFS 0.5±2.7 vs. -0.9±1.1, p=0.299; HSI 42.3±7.3 vs. 36.4±4.5, p=0.008; VAI 2.4±2.2 vs. 0.8±0.3, p=1.000; and TyG 8.8±0.6 vs. 8.0±0.3, p<0.001 (ANOVA with Bonferroni post-hoc test), thus demonstrating the ability of these tests to confidently diagnose the presence of steatosis of any amount. However, only the FLI index and the NAFLD-LFS were able to discriminate between moderate and mild steatosis (33-66% vs. 5-33%): FLI 80±20 vs. 70±22, respectively, p=0.004; NAFLD-LFS 1.9±2.6 vs. 0.5±2.7, p=0.001; HSI 44.2±6.2 vs. 42.3±7.3, p=0.185; VAI 3.7±8.3 vs. 2.4±2.2, p=0.472; and TyG 9.0±0.7 vs. 8.8±0.6, p=0.160 (ANOVA with Bonferroni post-hoc test). None of these indexes distinguished between moderate and severe steatosis (33-66% vs. >66%): FLI 80±20 vs. 77±22, respectively; NAFLD-LFS

1.9±2.6 vs. 2.2±2.8; HSI 44.2±6.2 vs. 45.1±6.5; VAI 3.7±8.3 vs. 3.3±3.2; and TyG 9.0±0.7 vs. 8.9±0.7, all p=1.000 (ANOVA with Bonferroni post-hoc test). (**Fig.1**)

The diagnostic accuracy of the five surrogate biomarkers for steatosis >5% as detected by liver biopsy is shown in **Fig. 2**. All the fatty liver markers displayed an acceptable accuracy in estimating the presence of steatosis of any amount vs. no steatosis. The VAI and TyG yielded the best AUROCs of 0.92 (95%CI 0.85-0.95) and 0.90 (0.84-0.94), respectively. FLI, NAFLD-LFS and HSI yielded AUROCs of 0.83 (0.72-0.91), 0.80 (0.69-0.88), and 0.81 (0.71-0.88), respectively. **Table 2** shows the sensitivity, specificity, NPV, PPV and LR for estimating histological steatosis $\geq$5%, for the optimal cut-off of each steatosis biomarker, as determined by applying the Youden method. FLI values greater than 60, NAFLD-LFS >0.16, HSI >41.6, VAI >1.25 and TyG >8.38, all had a PPV of 99% for predicting steatosis $\geq$5%.

The diagnostic performance of the five fatty liver biomarkers for estimating histological moderate/severe (>33%) vs. no/mild (0-33%) steatosis is shown in **Fig. 3** and **Table 2**. The accuracy of all these indexes in detecting the highest grades of steatosis (>33%) decreased to fair-very poor. NAFLD-LFS yielded the best AUROCs of 0.72 (0.66-0.77). With an optimal cut-off of >0.16 NAFLD-LFS predicted moderate-severe steatosis with sensitivity of 78% and specificity of 59%.

The diagnostic performance of the five steatosis biomarkers for the presence of steatosis diagnosed by ultrasound was rather poor: the AUROCs were 0.56 (0.48-0.64) for FLI, 0.71 (0.63-0.79) for NAFLD-LFS, 0.65 (0.58-0.73) for HSI, 0.60 (0.51-0.70) for VAI and 0.63 (0.54-0.71) for TyG. After restricting the analyses to the 241 patients with liver ultrasound indicative of hepatic steatosis [mean steatosis percentage 48±22%; 156 (65%) with histological moderate/severe steatosis (>33%)], we confirmed the inability of all fatty liver markers to accurately predict more severe steatosis grades. Indeed, the AUROCs for estimating histological moderate/severe (>33%) vs. no/mild (0-33%) steatosis were 0.60 (0.53-0.68) for FLI, 0.69 (0.61-0.76) for NAFLD-LFS, 0.58 (0.50-0.66) for HSI, 0.57 (0.49-0.64) for VAI and 0.53 (0.46-0.61) for TyG.

Impact of fibrosis on steatosis markers diagnostic accuracy

We next asked if fibrosis is a confounder of the relationship between serum steatosis markers and the amount of liver fat. Patients with no or mild fibrosis (F0-F2) had a similar amount of histological steatosis as those with advanced fibrosis (bridging fibrosis/cirrhosis, F3-F4): mean amount

of steatosis: 41±26% vs. 45±21%, respectively, p=0.202; steatosis>33% in 54% vs. 64% of cases, respectively, p=0.122). Surprisingly, the mean values of all the surrogate markers of steatosis were significantly higher in the presence of bridging fibrosis/cirrhosis **(Table 3)**. This fibrosis-related confounding effect was more pronounced in the subgroup with no/mild steatosis (**Figure 4**). Multiple linear regression analysis confirmed that, except for HSI, all the surrogate biomarkers of steatosis were significantly correlated with fibrosis, independently from steatosis, as assessed with liver biopsy (**Table 4**).

Impact of necroinflammation on steatosis markers diagnostic accuracy

In patients with NAFLD steatosis can exist either alone or in association with inflammation and liver cell injury. Therefore we investigated whether steatohepatitis is a confounder of the association between serum steatosis biomarkers and liver fat.

All five steatosis markers were significantly higher in patients with NASH than in those without NASH. This was also true for all five markers in the subset of patients with no or mild steatosis (0-33%). In those with moderate/severe steatosis, FLI and the NAFLD-LFS were still significantly higher in patients with NASH than in those with steatosis alone (**Supplementary Table 1**). Multiple linear regression analysis showed that FLI and the NAFLD-LFS were significantly correlated with lobular inflammation, and the VAI and the TyG scores with hepatocellular ballooning, independently from histologically-assessed steatosis. Only HSI was not clearly associated neither with ballooning nor with inflammation (**Table 4**). Moreover, FLI, NAFLD-LFS and HSI were significantly associated with advanced NASH (**Supplementary Table 1**). However, no panel of biomarkers predicted with acceptable accuracy NASH or advanced NASH [(AUROCs for NASH and advanced NASH, respectively: FLI 0.67 (0.61-0.73) and 0.69 (0.62-0.77); NAFLD-LFS 0.70 (0.64-0.76) and 0.75 (0.68-0.83); HSI 0.61 (0.55-0.67) and 0.61 (0.51-0.70); VAI 0.63 (0.56-0.69) and 0.59 (0.49-0.70); TyG 0.62 (0.56-0.68) and 0.57 (0.47-0.66)].

Correlation of steatosis markers with insulin-resistance as assessed with HOMA-IR

Finally, given the close pathogenetic link between steatosis and insulin resistance, we investigated if steatosis markers were independently correlated with HOMA-IR.

As expected, the mean value of HOMA-IR in our cohort was quite elevated (5.0±5.4) and HOMA-IR showed a significant positive linear trend across the histological steatosis grades (steatosis <5%: 1.6±0.8, 5-33%: 4.2±5.9, 33-66%: 5.5±5.4, >66%: 5.8±5.1; ANOVA for trend: p=0.009). All the 5 steatosis biomarkers had a significant positive correlation with HOMA-IR. However, the strength of the correlation was weak-to-moderate for the majority of the surrogate biomarkers (Pearson's coefficient: 0.287 for FLI, 0.353 for HSI, 0.156 for VAI and 0.334 for TyG). NAFLD-LFS showed the strongest correlation with HOMA-IR (Pearson's coefficient: 0.859). Multiple linear regression analysis confirmed that all the five steatosis biomarkers were significantly correlated with insulin resistance as assessed with HOMA-IR independently from the histological grades of steatosis (**Table 4**).

DISCUSSION

This study attempted to independently validate in a head-to-head comparison and a large population of patients with liver biopsy for suspected NAFLD, five previously published panels of biomarkers of liver steatosis. Moreover, we inquired whether these markers can be used not merely for the detection but also for the quantification of steatosis. Importantly, we tried to determine whether fibrosis or steatohepatitis can confound their relationship with liver fat. We show that all five surrogate biomarkers of steatosis (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI and TyG) are able to discriminate between the absence and the presence of steatosis with an overall good diagnostic performance. Moreover, all the biomarkers well correlated with insulin resistance. Therefore, they should be useful screening tools to rule in NAFLD in patients with cardiometabolic risk factors. However, these biomarker panels are insufficiently accurate for the quantification of steatosis, and thus their value for monitoring changes in steatosis induced by pharmacological agents, diet and lifestyle measures or simply the natural course of the disease, will probably be limited. Unexpectedly, fibrosis and inflammation are important confounders of the relation between liver fat and these steatosis biomarkers. All markers were higher in patients with steatohepatitis than in those with steatosis alone even if the amount of liver fat was similar. Besides they all correlated with features of steatohepatitis (lobular inflammation, hepatocyte ballooning) independent of liver fat. Patients with advanced fibrosis had higher values for all these markers than those with minimal or no fibrosis despite adjustment for the amount of liver fat.

In light of the hepatic and extrahepatic consequences of liver fat accumulation there is a need for diagnosis and quantification of steatosis. Many studies have linked steatosis (defined by ultrasound) with cardiovascular outcomes including endothelial dysunction, early atherosclerotic lesions or coronary artery calcifications (Villanova, Moscatiello et al. 2005; Volzke, Robinson et al. 2005; Kim, Choi et al. 2012). Steatosis can predict future cardiovascular events (Wong, Wong et al. 2011). This prediction is often independent of traditional cardiovascular risk factors (Targher, Day et al. 2010). therefore the identification of steatosis may be important for selecting patients at highest risk. Studies performed so far have not measured the risk in relation to the amount of liver fat as the diagnosis of steatosis was often made by liver ultrasound, an imaging method not suitable for quantification. Other studies have shown that steatosis predicts the occurrence of diabetes (Park, Seo et al. 2013) and other components of the metabolic syndrome (Adams, Waters et al. 2009) including arterial hypertension (Sung, Wild et al. 2014). Moreover, in type 2 diabetic patients treated with insulin,

the amount of hepatic fat is the main determinant of daily insulin requirements.(Ryysy, Hakkinen et al. 2000) Finally, the monitoring of patients treated for NASH, either by dietary or lifestyle interventions or future pharmacological therapies requires a reliable method of liver fat quantification. It has been shown that dietary interventions result in very early changes in steatosis that predict overall body weight and fat-mass reductions. (Petersen, Dufour et al. 2005) Therefore, a simple, inexpensive, readily available and, ideally, serum-based method of steatosis detection and quantification would be useful for the management of NAFLD patients.

Several surrogate biomarkers of steatosis have been proposed but the methodology used for the initial validation and the study of their performances varies widely. Importantly, they haven't been tested against liver biopsy, neither compared head-to-head in a single population. The Fatty Liver Index has been developed in a cohort of patients from the general population with ultrasound-diagnosed hepatic steatosis, either of alcoholic or metabolic origin.(Bedogni, Bellentani et al. 2006) The strength of FLI as a surrogate marker comes from the demonstration that it can predict clinical outcomes related to the metabolic syndrome. The FLI has been associated with hepatic, cardiovascular and cancer-related mortality, and also with reduced insulin sensitivity, risk of type 2 diabetes, accelerated atherosclerosis and cardiovascular risk.(Gastaldelli, Kozakova et al. 2009; Calori, Lattuada et al. 2011). Other studies confirmed an association of FLI with all-cause and cardiovascular mortality in patients at high risk of coronary artery disease (Lerchbaum, Pilz et al. 2013). While clinically relevant, these associations might be conveyed independently of steatosis *per se* since the FLI calculation is build upon anthropometric or biologic measures that are part of the phenotype of the metabolic syndrome. In fact some studies have found only a limited correlation between FLI and the amount of liver fat *per se*, as defined by magnetic resonance spectroscopy (Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012; Kahl, Strassburger et al. 2014) and no other quantitative assessment of FLI vs. liver fat or changes in liver fat are available. Hence the adequacy of FLI as a quantitative marker of steatosis is unknown. The NAFLD liver fat score has been developed against magnetic resonance spectroscopy as a measure of liver fat but the correlation of this marker with hepatic histology has not been studied.(Kotronen, Peltonen et al. 2009) Although there is limited independent validation so far (Wlazlo, van Greevenbroek et al. 2012) one study has shown that NAFLD-LFS can predict incident diabetes.(Balkau, Lange et al. 2010). Hepatic steatosis index has been developed from a huge case-control study involving more than 5000 Korean patients with ultrasound-detected NAFLD.(Lee, Kim et

al. 2010). External validation has been so far limited and the correlation with liver histology not studied. However the HIS seems to predict incident metabolic syndrome (Cicero, D'Addato et al. 2013). VAI is a marker of visceral adipose dysfunction (increased lipolysis, imbalanced adipocytokine production) associated with cardiovascular events and inversely correlated with insulin sensitivity. (Amato, Giordano et al. 2010) Given the strong link between the expansion of an inflammed insulin resistant visceral adipose tissue and NASH (van der Poorten, Milner et al. 2008) and the fact that at least two thirds of the liver fatty acids are derived from circulating free fatty acids (Donnelly, Smith et al. 2005) it was anticipated that VAI would be associated with liver fat. The independent association between VAI and histologically defined steatosis has been demonstrated in genotype 1 infected HCV patients (Petta, Amato et al. 2010) but was not reported in patients with NAFLD (Petta, Amato et al. 2012). Finally, the TyG index, which is the product of fasting triglycerides and glucose, inversely correlates with reduced insulin sensitivity determined by glucose clamp studies (Guerrero-Romero, Simental-Mendia et al. 2010) and predicts the occurence of type 2 diabetes (Lee, Kwon et al. 2014). The TyG index independently predicted moderate to severe steatosis in patients with genotype 1 chronic HCV (Petta, Di Marco et al. 2011) but has not been studied in NAFLD.

The current study reports for the first time on the association between two surrogate markers of insulin resistance, the VAI and the TyG index, and histologically defined hepatic steatosis in an homogenous population of NAFLD patients. This confirms the pathophysiological link existing between visceral adiposity, insulin resistance and hepatic steatosis. While both markers were performant at diagnosing the presence of steatosis, they were insufficiently discriminative between mild, moderate and severe steatosis and therefore unable to provide a reliable quantification of liver fat. The same holds true for FLI, NAFLD-LFS and HSI, initially validated as steatosis markers. These data help better define the role these markers may have in clinical practice. First, these markers can be used for the diagnosis of hepatic steatosis in retrospective series where ultrasound is unavailable. Second, these markers can be used for identifying patients with steatosis among those exposed to cardio-metabolic risk factors, all of them with similar diagnostic accuracy. Indeed, in most settings, hepatic ultrasound is not a routine examination in cardiovascular and metabolic screening. Moreover it is an operator-dependent procedure, usually performed by a radiologist and with a low sensitivity especially for mild steatosis (Saadeh, Younossi et al. 2002). This makes it highly unsuitable for large-scale, population-based screening. Third, in their current form, none of these steatosis biomarkers can be

used for segregating patients with low, moderate or high liver fat content, as this study clearly showed a plateau effect for all five biomarkers with increasing amounts of steatosis, defined histologically. Interestingly, a recent study in type-2 diabetic patients has shown that the performances of three surrogate markers, including FLI and HSI, for the prediction of steatosis, was very low. This finding from a population at high risk of moderate-to-severe steatosis also suggests a limited ability of theses surrogate biomarkers to quantitate steatosis.(Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012) This lack of quantitative effect does not support the use of these markers for monitoring changes in liver fat in the setting of pharmacological or non-pharmacological (diet and lifestyle) interventions or even during the natural course of the disease. Moreover, more specific serum markers of liver fat need to be identified since this study has shown that hepatic inflammation and fibrosis significantly impact all these indices and may confound the relationship with liver fat. Of note, the interaction of the TyG index and the VAI with hepatic inflammation has already been shown by Petta *et al.* in patients with chronic hepatitis C (Petta, Di Marco et al. 2011) and the association between VAI and hepatic inflammation and fibrosis has been described in a smaller series of NAFLD patients (Petta, Amato et al. 2012) by the same author. This clearly denotes the lack of specificity of these markers for hepatic steatosis. Finally, we showed that all the 5 surrogate markers of steatosis were correlated with insulin resistance as assessed with HOMA-IR independently from the histological grades of steatosis. FLI and NAFLD-LFS have been correlated with insulin resistance and type 2 diabetes incidence in several studies.(Gastaldelli, Kozakova et al. 2009; Balkau, Lange et al. 2010; Calori, Lattuada et al. 2011; Bozkurt, Gobl et al. 2012) Interestingly a recent study among non-diabetic patients has demonstrated that NAFLD-LFS, HSI and FLI had modest accuracy in detecting steatosis but were independently associated with insulin sensitivity and secretion.(Kahl, Strassburger et al. 2014) With regard to the other two markers, TyG has been specifically developed to predict insulin resistance and has been demonstrated to have better performance than HOMA-IR and to predict the development of diabetes.(Simental-Mendia, Rodriguez-Moran et al. 2008; Guerrero-Romero, Simental-Mendia et al. 2010; Vasques, Novaes et al. 2011; Lee, Kwon et al. 2014) Finally, VAI has been associated with insulin resistance and diabetes incidence in different settings.(Bozorgmanesh, Hadaegh et al. 2011; Ciresi, Amato et al. 2012; Oh, Sung et al. 2013) Our study confirms that, despite their limitations in assessing steatosis amount but in parallel with the satisfactory performance in detecting steatosis, these surrogate biomarkers might be used as rough clinical estimates of insulin resistance, the major determinant of NAFLD.

This study has several strengths. It is a large series of patients with suspected NAFLD with available liver histology, the reference standard for the assessment of liver injury. This allows for the simultaneous assessment of the confounding effect of hepatic lesions other than steatosis, mainly necroinflammation and fibrosis. It is a head-to-head comparison of all five biomarkers thus avoiding pitfalls related to spectrum effect of the sampled population, at least as far as the direct comparison between the markers. There are also some limitations. It is a retrospective study in a selected population of patients referred to a tertiary care liver clinic. Although most patients were exposed to cardio-metabolic risk factors, they might not be representative of the large population of similarly exposed patients without any indication of liver dysfunction. By studying the correlation between hepatic fat content determined by magnetic resonance spectroscopy and FLI and NAFLD-LFS, and reviewing discordant results (Lerchbaum, Gruber et al. 2011; Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012; Kahl, Strassburger et al. 2014), others have emphasized the significant impact of the selection of the study population (Kahl, Strassburger et al. 2014). Future studies should incorporate comercially available serum markers such as Steatotest which weren't available for a majority of patients in this series.

In conclusion, there is a strong medical need for clinical and research purposes of simple, non-invasive, cost-effective and reliable tools for diagnosing and quantifying hepatic steatosis. The panels of biomarkers available up to now are performant for the detection of fatty liver and the prediction of insulin resistance, but lack the ability to quantitate liver fat and therefore are of limited clinical utility. Moreover they are prone to substantial confounding due to steatohepatitis and advanced fibrosis. More research is needed to identify truly independent and quantitative markers of steatosis.

ACKNOWLEDGMENTS

Members of the LIDO (Liver Injury in Diabetes and Obesity) Study Group: André Grimaldi, Philippe Giral, Eric Bruckert, Arnaud Basdevant, Karine Clement, Jean-Michel Oppert, Agnès Hartemann-Heurtier, Fabrizio Andreelli, Judith Aron-Wisniewski, Sophie Gombert, Sophie Jacqueminet, Arnaud Cocaul, Fabienne Fouffelle, Joseph Moussalli, Dominique Thabut, Pascal Lebray, Philippe Podevin, Dominique Bonnefont-Rousselot, Randa Bittar, Yves Benhamou, Carole Bernhardt, Hôpital Pitié-Salpêtrière; Christian Boitard, Etienne Larger, Agnès Sola, Martine El-Etr, Hôpital Hotel-Dieu; Jean-François Gautier, Hôpital Saint-Louis; Lawrence Serfaty, Chantal Housset, Jacqueline Capeau, Hôpital Saint-Antoine, all in Paris, France.

Table 1. Study group baseline characteristics (N = 324)	
Age (years)	54 (45-60)
Males, n (%)	206 (64)
Alcohol consumption (g/d)	0 (0-5)
BMI (kg/m^2)	29 (26-33)
Waist circumference, (cm)	101 (92-109)
Diabetes type2, n (%)	133 (41)
Arterial HTN, n (%)	151 (47)
Hypertriglyceridemia, n (%)	181 (56)
Low HDLc, n (%)	97 (35)
Metabolic syndrome, n (%)	158 (50)
HOMA-IR	3.3 (2.3-5.6)
ALT (IU/L)	60 (41-89)
AST (IU/L)	40 (32-54)
GGT(IU/L)	65 (39-117)
US positive for steatosis, n (%)	241 (81)
Histological data	
Steatosis	40 (20-70)
None (<5%), n (%)	15 (5)
Mild (5-33%), n (%)	125 (39)
Moderate (33-66%), n (%)	97 (30)
Severe (>66%) ,n (%)	87 (27)
Advanced fibrosis (F3/4), n (%)	76 (24)
NASH, n (%)	171 (53)
Advanced NASH, n (%)	38 (12)
Steatosis markers	
FLI	80 (58-93)
NAFLD liver fat score	0.8 (-0.5 - 2.4)
HSI	42.8 (38.6-47.8)
VAI	1.8 (1.2-3.2)
TyG	8.8 (8.4-9.3)

Data are expressed as median (IQR) and as frequency (percentage).

Table 2. Diagnostic values of steatosis markers for predicting steatosis in comparison to liver biopsy

Steatosis>5%	AUROC (95%CI)	Sensitivity,%	Specificity,%	PPV,%	NPV,%	LR
FLI (>60)	0.83 (0.72-0.91)	76	87	99	15	5.7
VAI (>1.25)	0.92 (0.85-0.95)	79	92	99	16	9.4
NAFLD liver fat score (>0.16)	0.80 (0.69 -0.88)	65	87	99	11	4.9
TyG (>8.38)	0.90 (0.84 -0.94)	80	92	99	16	10.4
HSI (>41.6)	0.81 (0.71-0.88)	61	93	99	10	9.2
Steatosis>33%						
FLI (>82)	0.65 (0.59-0.71)	59	69	71	56	1.9
VAI (>1.36)	0.59 (0.52-0.66)	74	41	64	53	1.25
NAFLD liver fat score (>0.16)	0.72 (0.66-0.77)	78	59	71	67	1.89
TyG (>8.75)	0.59 (0.52-0.65)	58	58	64	51	1.4
HSI (>43.0)	0.65 (0.58-0.70)	59	68	71	56	1.8

Table 3. Mean ± SD values of steatosis markers according to the amount of fibrosis

	No/Mild fibrosis (F0-2)	Advanced fibrosis (F3-4)	p
Histological steatosis	41±26	45±21	0.202
FLI	70±23	84±17	<0.001
VAI	2.8±5.4	3.6±3.7	0.233
NAFLD liver fat score	0.9±2.5	2.6±3.3	<0.001
TyG	8.8±0.7	9.0±0.7	0.013
HSI	43.1±6.6	44.2±7.9	0.223

Table 4. Multiple linear regression analysis assessing the impact of fibrosis, necroinflammation and insulin resistance on the relationship between steatosis markers and histologically assessed liver steatosis

	FLI		VAI		NAFLD liver fat score		TyG		HSI	
	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p
Histological steatosis (grades)	4.656	0.001	0.425	0.223	0.753	<0.001	0.099	0.023	1.722	<0.001
Histological fibrosis (Kleiner stages)	5.971	<0.001	0.552	0.030	0.623	<0.001	0.104	0.001	0.537	0.089

	FLI		VAI		NAFLD liver fat score		TyG		HSI	
	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p
Histological steatosis (grades)	4.936	<0.001	0.450	0.203	0.680	<0.001	0.100	0.026	1.616	<0.001
Histological ballooning (grades)	2.892	0.132	1.494	0.003	0.397	0.082	0.131	0.032	0.461	0.438
Histological lobular inflammation (grades)	6.088	0.005	-0.443	0.426	1.024	<0.001	0.051	0.461	1.197	0.075

	FLI		VAI		NAFLD liver fat score		TyG		HSI	
	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p	Beta coefficient	p
Histological steatosis (grades)	5.995	<0.001	0.244	0.553	0.443	<0.001	0.072	0.119	1.537	0.001
HOMA-IR	1.066	<0.001	0.151	0.025	0.423	<0.001	0.040	<0.001	0.413	<0.001

VII-2. Tableaux supplémentaires de l'article 3

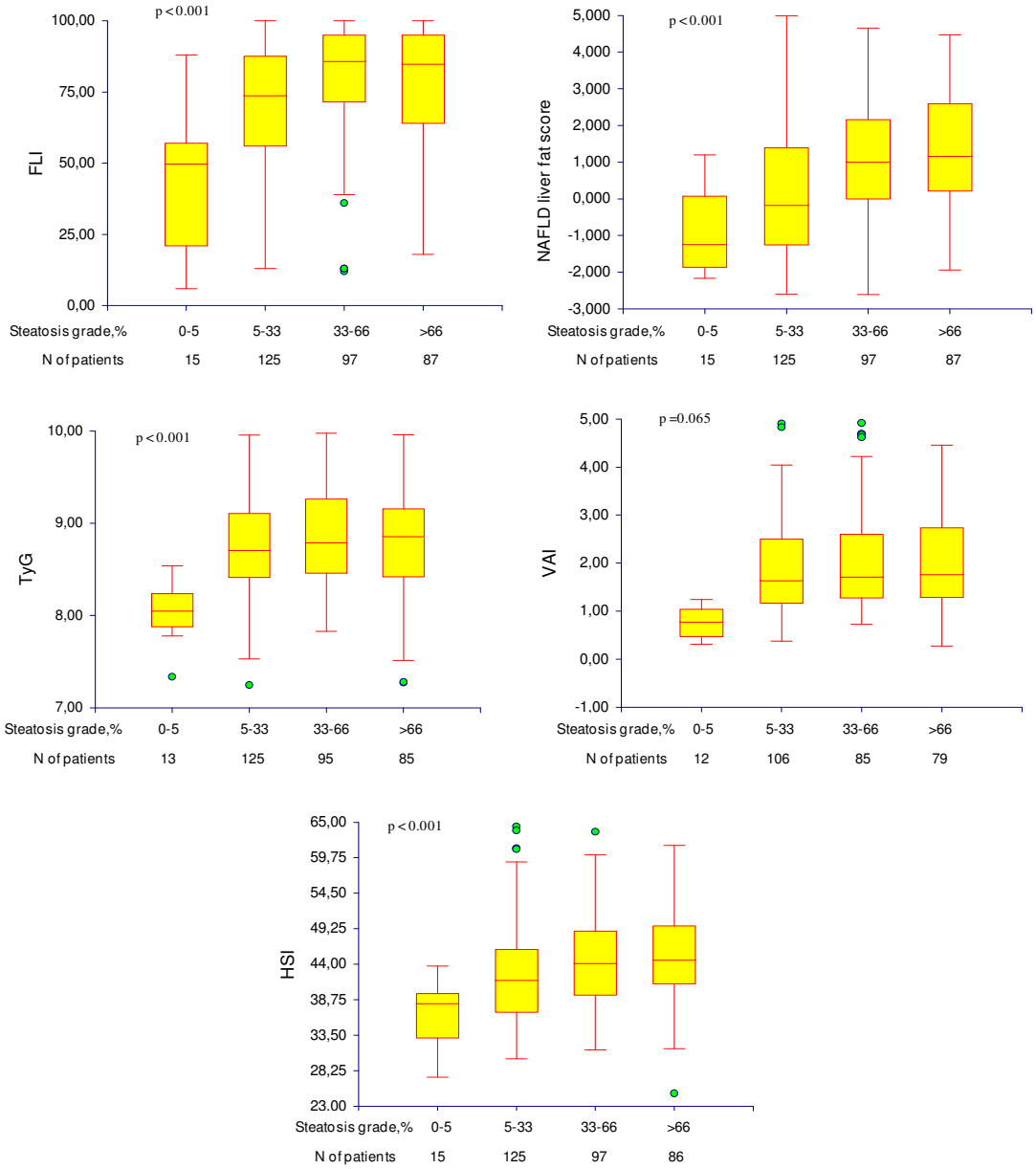
Supplementary Table 1. Mean ± SD values of steatosis markers according to the presence of NASH and advanced NASH

	No NASH[a]	NASH[a]	p value	No advanced NASH[b]	Advanced NASH[b]	p value
All Patients						
FLI	66±25	80±19	<0.001	72±23	86±13	<0.001
NAFLD liver fat score	0.4±2.3	2.1±2.9	<0.001	1.0±2.6	3.4±3.5	<0.001
TyG	8.7±0.7	9.0±0.6	<0.001	8.8±0.7	9.0±0.8	0.165
VAI	2.3±2.4	3.6±6.6	0.029	2.8±5.2	3.9±4.3	0.268
HSI	41.8±6.5	44.7±7.0	<0.001	43.1±6.9	45.6±7.0	0.033
Steatosis <33%						
FLI	62±24	76±21	<0.001	n.a	n.a.	n.a.
NAFLD liver fat score	-0.1±2.4	1.2±2.8	0.005	n.a	n.a.	n.a.
TyG	8.6±0.6	9.0±0.6	<0.001	n.a	n.a.	n.a.
VAI	1.9±2.2	2.8±1.8	0.036	n.a	n.a.	n.a.
HSI	40.5±6.1	43.7±8.7	0.014	n.a	n.a.	n.a.
Steatosis >33%						
FLI	73±25	82±18	0.004	n.a	n.a.	n.a.
NAFLD liver fat score	1.2±2.1	2.5±2.9	0.003	n.a	n.a.	n.a.
TyG	8.9±0.8	9.0±0.7	0.435	n.a	n.a.	n.a.
VAI	2.7±2.5	3.9±7.7	0.246	n.a	n.a.	n.a.
HSI	43.7±6.5	45.1±6.2	0.152	n.a	n.a.	n.a.

[a] NASH was defined as the presence of at least 5% of steatosis with at least both grade 1 hepatocellular ballooning and lobular inflammation following a mainly centrilobular pattern of distribution.

[b] Advanced NASH was empirically defined as the simultaneous presence of moderate/severe steatosis (>33%), NASH and advanced fibrosis.

Fig. 1 Distribution of steatosis markers according to the histological grade of steatosis



The yellow box represents the interquartile range. The red line across the box indicates the median. The “whiskers” are the red lines that extend from the box to the highest and lowest values, excluding outliers (light green dots). ANOVA for trend analysis was performed to find out a linear trend across the steatosis grades.

Figure 2. AUROCs for diagnostic accuracy of steatosis markers in comparison to liver biopsy (Any steatosis ≥5%)

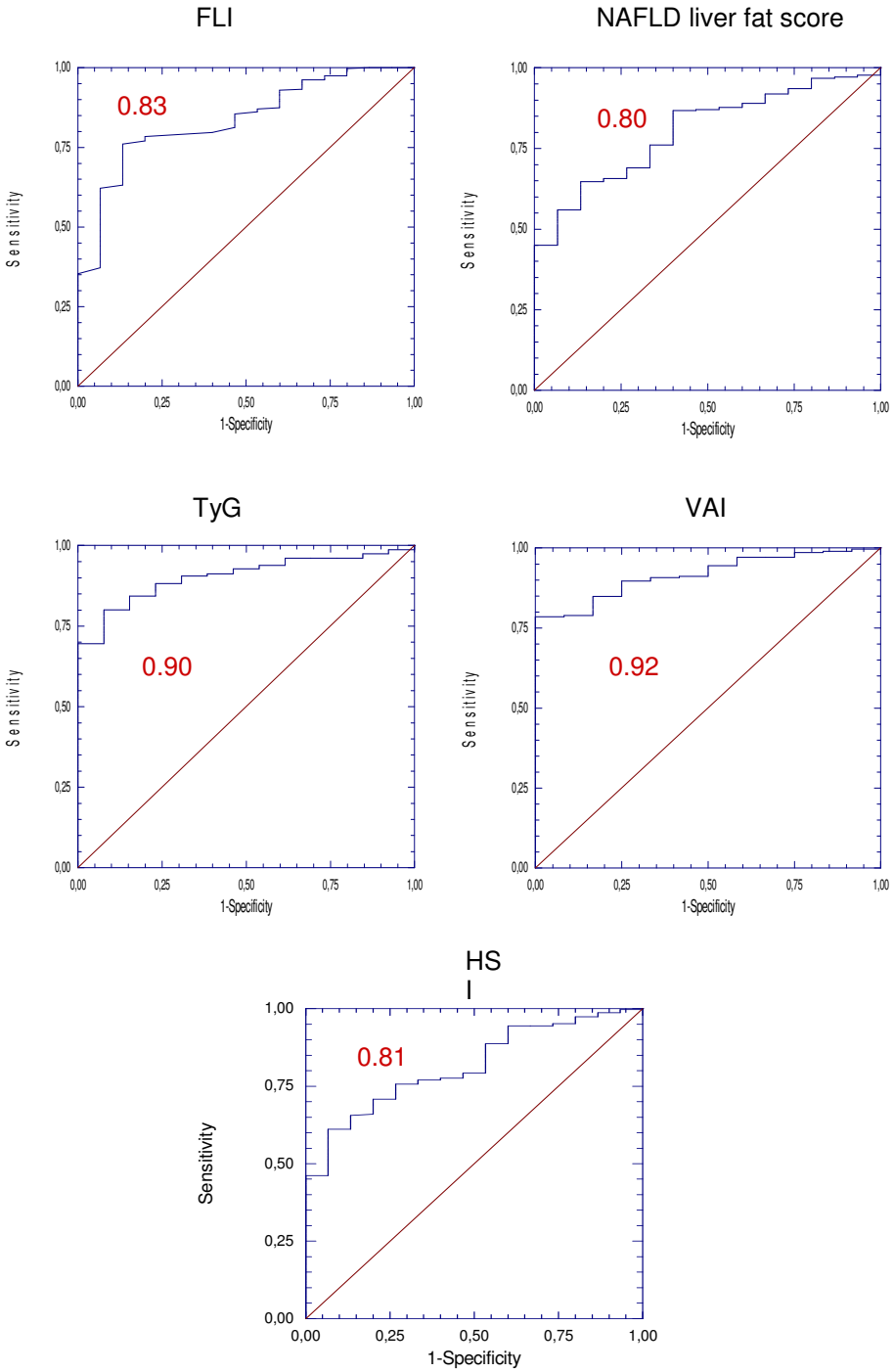


Figure 3. AUROCs for diagnostic accuracy of steatosis markers in comparison to liver biopsy (moderate/severe steatosis >33%)

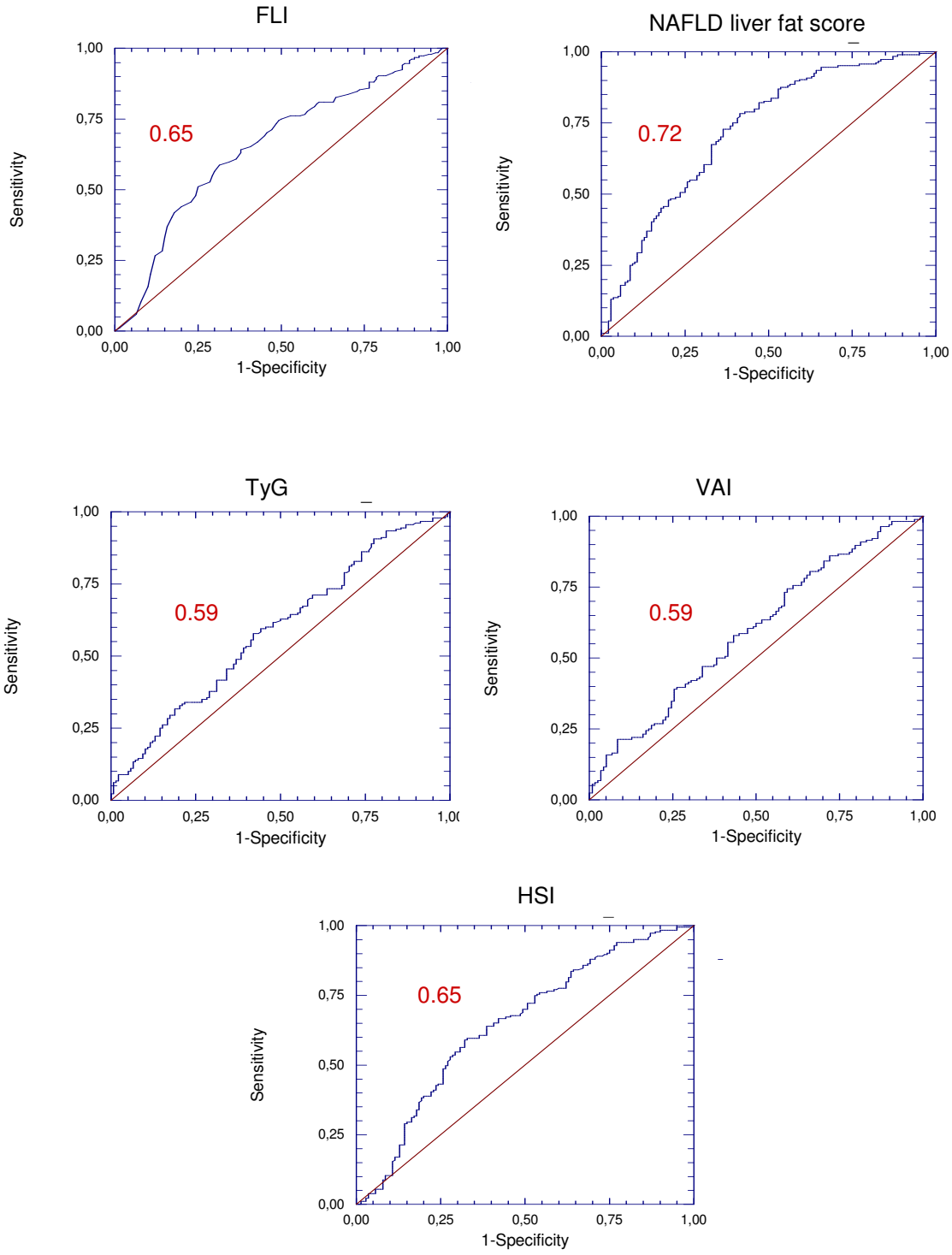
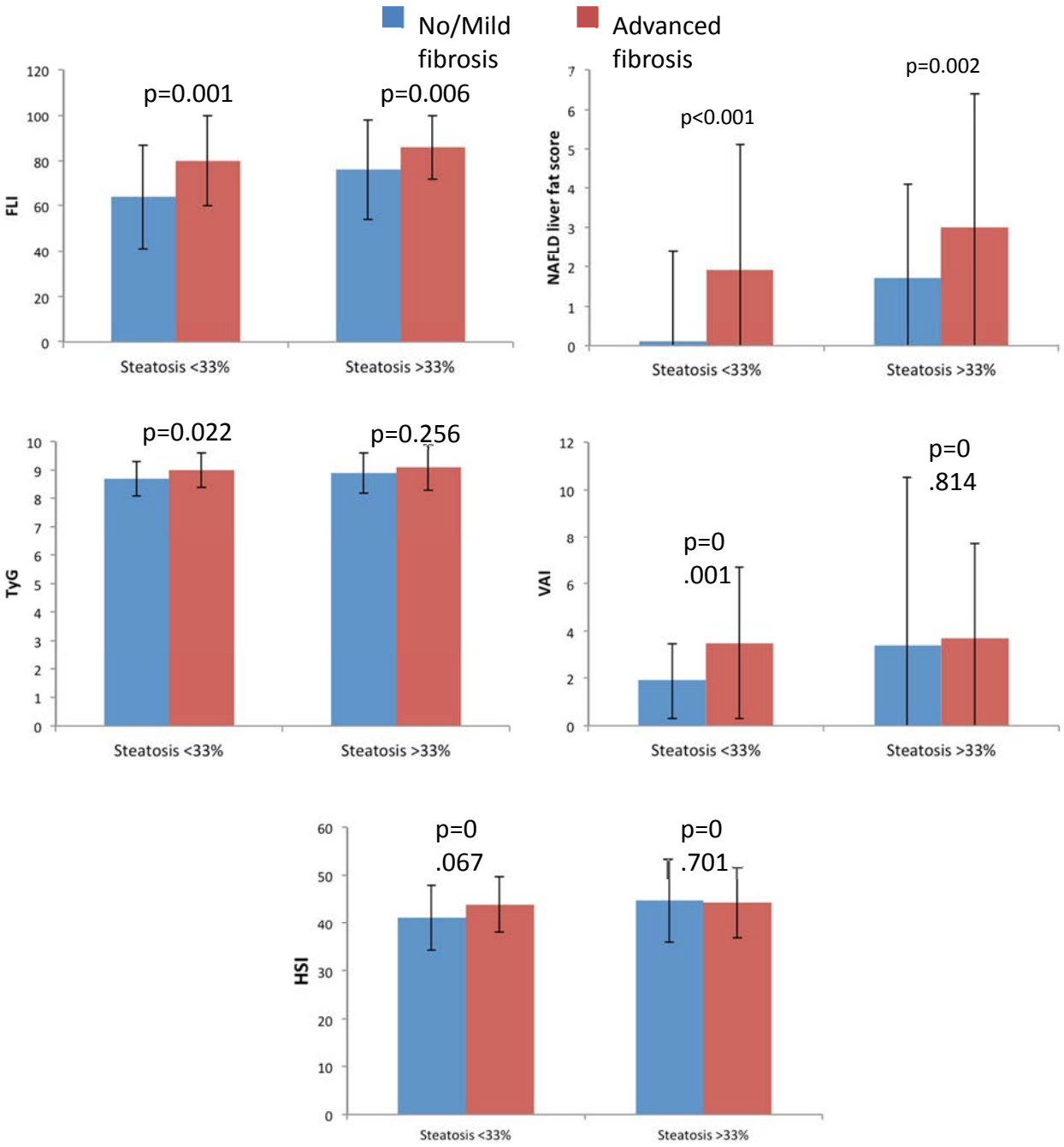


Figure 4. Confounding impact of fibrosis on mean values of steatosis markers



Data are represented as mean ± SD. Student's t-test was performed for ascertaining differences between steatosis markers according to fibrosis stage either for histologically assessed mild or moderate/severe steatosis.

VII-3. Discussion de l'article 3.

Cette étude avait comme objectif de valider de façon indépendante et de comparer face-à-face cinq marqueurs non-invasifs de la stéatose hépatique dans une large cohorte de patients atteints d'une NAFLD prouvée histologiquement.

Nos résultats montrent que les cinq marqueurs de la stéatose (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI et TYG) sont capables de distinguer entre l'absence et la présence d'une stéatose hépatique avec une bonne performance diagnostique. AUROCs de VAI 0.92 (95%CI 0.85-0.95), TyG 0.90 (0.84-0.94), FLI 0.83 (0.72-0.91), NAFLD-LFS 0.80 (0.69-0.88) et HSI 0.81 (0.71-0.88).

Par contre aucun marqueur était capable de quantifier la stéatose et donc leur utilisation en pratique clinique pour le suivi des changements de stéatose induite par des agents pharmacologiques, des mesures diététiques et du mode de vie ou de l'histoire naturelle de la maladie, sera probablement limitée.

Tous les marqueurs non-invasifs évalués avaient une corrélation positive significative à l'insulinorésistance et ils peuvent être utilisés pour le dépistage de NAFLD chez les patients présentant des facteurs de risque cardio-métabolique.

Les résultats montent que la fibrose et l'inflammation sont les facteurs confondants importants. Les valeurs de tous les marqueurs ont été plus élèves chez les patients ayant une stéatohépatite que chez ceux avec stéatose isolée, même si la quantité de stéatose était similaire. Tous les marqueurs étaient corrélés à des lésions de stéatohépatite (inflammation lobulaire et ballonnisation hépatocytaire) indépendamment de la stéatose. Les patients ayant une fibrose avancée avaient des valeurs plus élevées de tous les marqueurs par rapport à ceux qui ont eu peu ou pas de fibrose malgré ajustement sur la quantité de stéatose.

Notre étude a rapporté pour la première fois l'association entre deux marqueurs d'insulinorésistance (le VAI et le score TyG) et la stéatose hépatique dans une cohorte de patients atteints d'une NAFLD histologiquement prouvée. Cela confirme le lien physiopathologique existant entre l'adiposité viscérale, l'insulinorésistance et la stéatose hépatique.

Les résultats de notre étude peuvent aider à définir le rôle des marqueurs dans la pratique clinique. Ces marqueurs peuvent être utiles pour le diagnostic de stéatose hépatique dans les études rétrospectives quand l'échographie abdominale n'est pas disponible. Ils peuvent être utiles pour identifier les patients ayant une stéatose parmi ceux qui présentent des facteurs de risque cardio-métabolique. Notre étude a démontré un effet plateau pour ces cinq marqueurs de stéatose définie histologiquement, aucun parmi ces marqueurs ne peut être utilisé pour la quantification de stéatose. Cet effet a été déjà décrit dans une population à haut risque. Une étude récente réalisée chez les patients atteints de diabètes de type 2 a démontré une performance diagnostique très basse de plusieurs marqueurs non-invasifs pour prédire la stéatose hépatique (FLI et HSI) (Guiu, Crevisy-Girod et al. 2012).

Notre étude confirme que, malgré leurs limitations pour l'évaluation de la quantité de stéatose la une performance diagnostique pour la stéatose est satisfaisante.

Cette étude présente plusieurs points forts. Il s'agit d'une série portant sur un grand nombre de patients atteints de stéatose ou stéatohépatite prouvées histologiquement. Les données histologiques permettent d'évaluer l'effet confondant d'autres lésions hépatiques, principalement l'activité nécrotico-inflammatoire et la fibrose. Il s'agit d'une comparaison face-à-face de tous les cinq marqueurs de stéatose, en évitant les limitations liées à l'effet spectre dans la population étudiée.

Notre étude a aussi certaines limitations. Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée dans une population sélectionnée dans un centre hospitalier spécialisée. Bien que la plupart de nos patients présente des facteurs de risque cardio-métaboliques, ils pourraient ne pas être représentatifs du grand nombre de sujets avec stéatose hépatique dans la population générale.

En conclusion, il y a un fort besoin médical dans la pratique clinique et celle de recherche des marqueurs simples, non-invasifs, peu couteux et performants pour le diagnostic et la quantification de la stéatose hépatique. Les marqueurs disponibles actuellement sont performants pour la détection de la stéatose hépatique et la prédiction d'insulinorésistance, mais ils ne sont pas capables de quantifier la stéatose et leur utilité clinique reste limitée. En plus, ils surestiment d'une manière significative la stéatose hépatique en présence d'une stéatohépatite ou la fibrose avancée.

Chapitre VIII - Conclusion

L'histoire naturelle de la NAFLD est encore incomplètement connue. Les mécanismes physiopathologiques responsables de la progression d'une stéatose isolée, considérée comme bénigne et non évolutive, à une NASH, considéré comme la forme plus agressive de la maladie, restent à déterminer. La progression de la maladie varie selon individu et est en partie déterminée à l'exposition aux facteurs de risque cardio-métaboliques.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse m'ont permis de démontrer qu'une partie des patients atteints de stéatose hépatique peut évoluer vers la stéatohépatite bien définie et chez certains patients vers la fibrose septale et de définir la place des méthodes non invasives dans le suivi des patients ayant une maladie chronique du foie, en particulier la NAFLD.

Le premier article réalisé chez les patients atteints de la NAFLD avec des biopsies hépatiques de suivi m'a permis de montrer que même les sujets présentant une stéatose ans stéatohépatite peuvent progresser développer une stéatohépatite avec parfois fibrose avancée, surtout quand les facteurs de risque métaboliques se détériorent. Nos résultats montrent que la présence d'une inflammation lobulaire minime ou une fibrose (quelqu'un soit le stade) augmente nettement le risque de progression histologique à moyen terme, tandis que les patients avec stéatose isolée ont un risque très faible. Par conséquent, un suivi régulier de ces patients est nécessaire et leur pronostic ne peut pas être considéré comme bénin.

L'étude sur la variabilité des mesures d'élastographie à court terme chez des patients dont la fibrose hépatique est stable a permis de mettre en évidence les limites de l'élastographie utilisée comme seule méthode de suivi de la fibrose chez les patients atteints d'hépatopathie chronique. Cette variabilité des mesures d'élastographie a été observée tout au long du spectre des valeurs d'élastométrie. Ceci suggère que la variabilité de la rigidité tissulaire hépatique (soit pour des raisons biologiques soit en raison de méthodes de mesure analytiques) est un phénomène général survenant à tous les stades de fibrose et non limitée aux patients atteints de fibrose avancée. Nous avons également identifié certains facteurs qui devraient inciter à la prudence dans l'interprétation des résultats d'élastométrie. L'évaluation réalisée par différents opérateurs et/ou des opérateurs moins expérimentés était un facteur prédictif majeur de variabilité des mesures d'élastographie. En limitant l'analyse au même

opérateur expérimenté en quelque sorte réduit la variabilité. Nos données montrent que plus le ratio IQR/M est faible, plus la variabilité l'est également; ceci confirme l'importance de la mesure de la dispersion des résultats pour une évaluation correcte des résultats de l'élastographie, y compris pour l'évaluation longitudinale. Parmi les facteurs liés au patient, l'IMC a été associé de manière systématique à la discordance des examens successifs. Une faible élévation du taux d'ALT (deux fois la normale) a un impact non-négligeable sur la capacité diagnostique de l'élastographie.

Cette étude montre les limites de l'élastographie dans le suivi longitudinal de la fibrose hépatique et suggère fortement que chez les malades atteints d'hépatopathie chronique, ce suivi devrait au mieux s'appuyer sur une méthode additionnelle d'évaluation de la fibrose.

Enfin, l'étude sur la performance diagnostique et les limites de 5 biomarqueurs non-invasifs (FLI, NAFLD-LFS, HSI, VAI et TyG) réalisée dans une grande cohorte des patients atteint d'une NAFLD histologiquement prouvée, a montré que tous ces marqueurs sont capables de distinguer entre absence et présence d'une stéatose hépatique avec une bonne performance diagnostique. Par contre aucun marqueur n'était capable de quantifier la stéatose puisqu'il y avait un effet plateau avec des quantités croissantes de stéatose histologique. Par conséquent leur utilisation en pratique clinique pour le suivi des variations de stéatose induites par des agents pharmacologiques, ou des mesures diététiques ou par l'histoire naturelle de la maladie, sera probablement limitée.

Tous les biomarqueurs non-invasifs évalués étaient corrélés à l'insulinorésistance. Ceci confirme les liens étroits entre accumulation de graisses et insulinorésistance hépatique. Ils peuvent être utilisés pour le dépistage de NAFLD chez les patients présentant des facteurs de risque cardio-métabolique. Néanmoins, de façon inattendue la fibrose et l'inflammation sont les facteurs confondants importants. Les valeurs de tous les biomarqueurs ont été plus élèves chez les patients ayant une stéatohépatite que chez ceux avec stéatose isolée, même si la quantité de stéatose était similaire.

Les résultats de notre étude peuvent aider à définir le rôle des marqueurs dans la pratique clinique. Ces marqueurs peuvent être utiles pour le diagnostic de stéatose hépatique dans les études rétrospectives quand l'échographie abdominale n'est pas disponible. Ils peuvent être utiles pour identifier les patients ayant une stéatose parmi ceux qui présentent des facteurs de risque cardio-métabolique. Ils ne peuvent cependant servir à suivre l'évolution de la stéatose autrement que pour en constater l'apparition/disparition.

Chapitre IX - Références bibliographies

(1994). "Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group." Hepatology **20**(1 Pt 1): 15-20.

(2010). "EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis." J Hepatol **53**(3): 397-417.

(2012). "EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **56**(4): 908-43.

Abiru, S., K. Migita, et al. (2006). "Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis." Liver Int **26**(1): 39-45.

Abu-Shanab, A. and E. M. Quigley (2010). "The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(12): 691-701.

Adams, L. A., P. Angulo, et al. (2005). "Nonalcoholic fatty liver disease." Cmaj **172**(7): 899-905.

Adams, L. A., A. Feldstein, et al. (2004). "Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction." Hepatology **39**(4): 909-14.

Adams, L. A. and A. E. Feldstein (2011). "Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis." J Dig Dis **12**(1): 10-6.

Adams, L. A., J. George, et al. (2011). "Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol Hepatol **26**(10): 1536-43.

Adams, L. A., K. D. Lindor, et al. (2004). "The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease." Am J Gastroenterol **99**(7): 1316-20.

Adams, L. A., J. F. Lymp, et al. (2005). "The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study." Gastroenterology **129**(1): 113-21.

Adams, L. A., S. Sanderson, et al. (2005). "The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies." J Hepatol **42**(1): 132-8.

Adams, L. A., O. R. Waters, et al. (2009). "NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study." Am J Gastroenterol **104**(4): 861-7.

Adhoute, X., J. Foucher, et al. (2008). "Diagnosis of liver fibrosis using FibroScan and other noninvasive methods in patients with hemochromatosis: a prospective study." Gastroenterol Clin Biol **32**(2): 180-7.

Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. (2005). "The metabolic syndrome--a new worldwide definition." Lancet **366**(9491): 1059-62.

Amato, M. C., C. Giordano, et al. (2010). "Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk." Diabetes Care **33**(4): 920-2.

Andersen, E. S., O. Weiland, et al. "Low liver stiffness among cirrhotic patients with hepatitis B after prolonged treatment with nucleoside analogs." Scand J Gastroenterol **46**(6): 760-6.

Andersen, E. S., O. Weiland, et al. (2011). "Low liver stiffness among cirrhotic patients with hepatitis B after prolonged treatment with nucleoside analogs." Scand J Gastroenterol **46**(6): 760-6.

Angulo, P. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." N Engl J Med **346**(16): 1221-31.

Angulo, P. (2007). "GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease." Aliment Pharmacol Ther **25**(8): 883-9.

Angulo, P., J. M. Hui, et al. (2007). "The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD." Hepatology **45**(4): 846-54.

Angulo, P., J. C. Keach, et al. (1999). "Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **30**(6): 1356-62.
Anstee, Q. M. and C. P. Day (2013). "The genetics of NAFLD." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(11): 645-55.
Anstee, Q. M., S. McPherson, et al. (2011). "How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease?" Bmj **343**: d3897.
Anstee, Q. M., G. Targher, et al. (2013). "Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(6): 330-44.
Anty, R., A. Iannelli, et al. (2010). "A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients." Aliment Pharmacol Ther **32**(11-12): 1315-22.
Arena, U., M. Lupsor Platon, et al. (2013). "Liver stiffness is influenced by a standardized meal in patients with chronic hepatitis C virus at different stages of fibrotic evolution." Hepatology **58**(1): 65-72.
Arena, U., F. Vizzutti, et al. (2008). "Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography." Hepatology **47**(2): 380-4.
Argo, C. K. and S. H. Caldwell (2009). "Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis." Clin Liver Dis **13**(4): 511-31.
Argo, C. K., P. G. Northup, et al. (2009). "Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis." J Hepatol **51**(2): 371-9.
Armstrong, M. J., L. A. Adams, et al. (2014). "Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **59**(3): 1174-97.
Arun, J., N. Jhala, et al. (2007). "Influence of liver biopsy heterogeneity and diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis in subjects undergoing gastric bypass." Obes Surg **17**(2): 155-61.
Ascha, M. S., I. A. Hanouneh, et al. "The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **51**(6): 1972-8.
Assy, N., K. Kaita, et al. (2000). "Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients." Dig Dis Sci **45**(10): 1929-34.
Balkau, B., C. Lange, et al. (2010). "Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: the French D.E.S.I.R. study." BMC Gastroenterol **10**: 56.
Baranova, A., S. J. Gowder, et al. (2006). "Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance." Obes Surg **16**(9): 1118-25.
Bass, N. M. and F. Y. Yao (2001). "The role of the interventional radiologist. Transjugular procedures." Gastrointest Endosc Clin N Am **11**(1): 131-61.
Baumeister, S. E., H. Volzke, et al. (2008). "Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation." Gastroenterology **134**(1): 85-94.
Bedogni, G., S. Bellentani, et al. (2006). "The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population." BMC Gastroenterol **6**: 33.
Bedogni, G., H. S. Kahn, et al. (2010). "A simple index of lipid overaccumulation is a good marker of liver steatosis." BMC Gastroenterol **10**: 98.
Bedogni, G., L. Miglioli, et al. (2005). "Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study." Hepatology **42**(1): 44-52.
Bedossa, P., D. Dargere, et al. (2003). "Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C." Hepatology **38**(6): 1449-57.
Bedossa, P., R. Moucari, et al. (2007). "Evidence for a role of nonalcoholic steatohepatitis in hepatitis C: a prospective study." Hepatology **46**(2): 380-7.

Bedossa, P., C. Poitou, et al. (2012). "Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients." Hepatology **56**(5): 1751-9.
Bellentani, S., G. Saccoccio, et al. (2000). "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy." Ann Intern Med **132**(2): 112-7.
Berzigotti, A., A. De Gottardi, et al. (2013). "Effect of meal ingestion on liver stiffness in patients with cirrhosis and portal hypertension." PLoS One **8**(3): e58742.
Beymer, C., K. V. Kowdley, et al. (2003). "Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery." Arch Surg **138**(11): 1240-4.
Boursier, J., A. Konate, et al. (2008). "Reproducibility of liver stiffness measurement by ultrasonographic elastometry." Clin Gastroenterol Hepatol **6**(11): 1263-9.
Boursier, J., A. Konate, et al. (2008). "Learning curve and interobserver reproducibility evaluation of liver stiffness measurement by transient elastography." Eur J Gastroenterol Hepatol **20**(7): 693-701.
Boza, C., A. Riquelme, et al. (2005). "Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass." Obes Surg **15**(8): 1148-53.
Bozkurt, L., C. S. Gobl, et al. (2012). "Fatty liver index predicts further metabolic deteriorations in women with previous gestational diabetes." PLoS One **7**(2): e32710.
Bozorgmanesh, M., F. Hadaegh, et al. (2011). "Predictive performance of the visceral adiposity index for a visceral adiposity-related risk: type 2 diabetes." Lipids Health Dis **10**: 88.
Bravo, A. A., S. G. Sheth, et al. (2001). "Liver biopsy." N Engl J Med **344**(7): 495-500.
Browning, J. D., L. S. Szczepaniak, et al. (2004). "Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity." Hepatology **40**(6): 1387-95.
Brunt, E. M. (2000). "Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond." Hepatology **31**(1): 241-6.
Brunt, E. M. (2009). "Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease." Clin Liver Dis **13**(4): 533-44.
Brunt, E. M. (2010). "Pathology of nonalcoholic fatty liver disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(4): 195-203.
Brunt, E. M. (2012). "Nonalcoholic fatty liver disease: what the pathologist can tell the clinician." Dig Dis **30 Suppl 1**: 61-8.
Brunt, E. M., C. G. Janney, et al. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions." Am J Gastroenterol **94**(9): 2467-74.
Brunt, E. M., D. E. Kleiner, et al. "Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings." Hepatology **53**(3): 810-20.
Buckley, A. and D. Petrunia (2000). "Practice guidelines for liver biopsy. Canadian Association of Gastroenterology." Can J Gastroenterol **14**(6): 481-2.
Bugianesi, E., N. Leone, et al. (2002). "Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **123**(1): 134-40.
Bureau, C., S. Metivier, et al. (2008). "Transient elastography accurately predicts presence of significant portal hypertension in patients with chronic liver disease." Aliment Pharmacol Ther **27**(12): 1261-8.
Cadranel, J. F. (2002). "[Good clinical practice guidelines for fine needle aspiration biopsy of the liver: past, present and future]." Gastroenterol Clin Biol **26**(10): 823-4.
Cadranel, J. F., P. Rufat, et al. (2000). "Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF)." Hepatology **32**(3): 477-81.

Caldwell, S. H., D. H. Oelsner, et al. (1999). "Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease." Hepatology **29**(3): 664-9.
Cales, P., F. Laine, et al. (2009). "Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD." J Hepatol **50**(1): 165-73.
Calori, G., G. Lattuada, et al. (2011). "Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up." Hepatology **54**(1): 145-52.
Castera, L., X. Forns, et al. (2008). "Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography." J Hepatol **48**(5): 835-47.
Castera, L., J. Foucher, et al. (2010). "Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations." Hepatology **51**(3): 828-35.
Castera, L., N. Goutte, et al. (2012). "How does transient elastography applicability impact on diagnostic accuracy? Results in 1044 patients with viral hepatitis and liver biopsies > 20 mm from a multicenter prospective cohort (Fibrostic)." Hepatology **56**: 224A-224A.
Castera, L., B. Le Bail, et al. (2009). "Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores." J Hepatol **50**(1): 59-68.
Castera, L., J. Vergniol, et al. (2005). "Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C." Gastroenterology **128**(2): 343-50.
Cerda, C., R. M. Perez-Ayuso, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome." J Hepatol **47**(3): 412-7.
Chalasani, N., Z. Younossi, et al. (2012). "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology." Gastroenterology **142**(7): 1592-609.
Chon, Y. E., E. S. Jung, et al. (2012). "The accuracy of noninvasive methods in predicting the development of hepatocellular carcinoma and hepatic decompensation in patients with chronic hepatitis B." J Clin Gastroenterol **46**(6): 518-25.
Cicero, A. F., S. D'Addato, et al. (2013). "Hepatic steatosis index and lipid accumulation product as middle-term predictors of incident metabolic syndrome in a large population sample: data from the Brisighella Heart Study." Intern Emerg Med **8**(3): 265-7.
Ciresi, A., M. C. Amato, et al. (2012). "Visceral adiposity index is associated with insulin sensitivity and adipocytokine levels in newly diagnosed acromegalic patients." J Clin Endocrinol Metab **97**(8): 2907-15.
Clark, J. M. (2006). "The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults." J Clin Gastroenterol **40 Suppl 1**: S5-10.
Clark, J. M., F. L. Brancati, et al. (2003). "The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States." Am J Gastroenterol **98**(5): 960-7.
Coco, B., F. Oliveri, et al. (2007). "Transient elastography: a new surrogate marker of liver fibrosis influenced by major changes of transaminases." J Viral Hepat **14**(5): 360-9.
Colecchia, A., L. Montrone, et al. (2012). "Measurement of spleen stiffness to evaluate portal hypertension and the presence of esophageal varices in patients with HCV-related cirrhosis." Gastroenterology **143**(3): 646-54.
Colli, A., P. Pozzoni, et al. (2010). "Decompensated chronic heart failure: increased liver stiffness measured by means of transient elastography." Radiology **257**(3): 872-8.
Corpechot, C., F. Carrat, et al. (2012). "Noninvasive elastography-based assessment of liver fibrosis progression and prognosis in primary biliary cirrhosis." Hepatology **56**(1): 198-208.

Corpechot, C., A. El Naggar, et al. (2006). "Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC." Hepatology **43**(5): 1118-24.
Cotler, S. J., K. Kanji, et al. (2004). "Prevalence and significance of autoantibodies in patients with non-alcoholic steatohepatitis." J Clin Gastroenterol **38**(9): 801-4.
Crespo, J., A. Cayon, et al. (2001). "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." Hepatology **34**(6): 1158-63.
Dam-Larsen, S., U. Becker, et al. (2009). "Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients." Scand J Gastroenterol **44**(10): 1236-43.
Dam-Larsen, S., M. Franzmann, et al. (2004). "Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death." Gut **53**(5): 750-5.
Dasarathy, S., J. Dasarathy, et al. (2009). "Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study." J Hepatol **51**(6): 1061-7.
Day, C. P. (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem." Clin Med **11**(2): 176-8.
Day, C. P. and O. F. James (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology **114**(4): 842-5.
de Ledinghen, V., C. Douvin, et al. (2006). "Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients." J Acquir Immune Defic Syndr **41**(2): 175-9.
de Ledinghen, V., V. Ratziu, et al. (2006). "Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study." J Hepatol **45**(4): 592-9.
de Ledinghen, V. and J. Vergniol (2008). "Transient elastography (FibroScan)." Gastroenterol Clin Biol **32**(6 Suppl 1): 58-67.
de Ledinghen, V., J. Vergniol, et al. (2013). "Non-invasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year survival of patients chronically infected with hepatitis B virus." Aliment Pharmacol Ther **37**(10): 979-88.
de Ledinghen, V., J. Vergniol, et al. (2010). "Feasibility of liver transient elastography with FibroScan using a new probe for obese patients." Liver Int **30**(7): 1043-8.
de Ledinghen, V., J. Vergniol, et al. (2012). "Screening for liver fibrosis by using FibroScan((R)) and FibroTest in patients with diabetes." Dig Liver Dis **44**(5): 413-8.
de Ledinghen, V., V. W. Wong, et al. (2012). "Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: comparison between M and XL probe of FibroScan(R)." J Hepatol **56**(4): 833-9.
Dixon, J. B., P. S. Bhathal, et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese." Gastroenterology **121**(1): 91-100.
Donnelly, K. L., C. I. Smith, et al. (2005). "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Invest **115**(5): 1343-51.
Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, et al. (2011). "Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis." Aliment Pharmacol Ther **33**(5): 525-40.
Dunn, W., R. Xu, et al. (2008). "Suspected nonalcoholic fatty liver disease and mortality risk in a population-based cohort study." Am J Gastroenterol **103**(9): 2263-71.
Ekstedt, M., L. E. Franzen, et al. (2009). "Alcohol consumption is associated with progression of hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease." Scand J Gastroenterol **44**(3): 366-74.

Ekstedt, M., L. E. Franzen, et al. (2006). "Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes." Hepatology **44**(4): 865-73.

Enomoto, M., M. Mori, et al. "Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy." Hepatol Res **40**(9): 853-61.

Enomoto, M., M. Mori, et al. (2010). "Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy." Hepatol Res **40**(9): 853-61.

Fassio, E., E. Alvarez, et al. (2004). "Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies." Hepatology **40**(4): 820-6.

Feldstein, A. E., P. Charatcharoenwitthaya, et al. (2009). "The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years." Gut **58**(11): 1538-44.

Feldstein, A. E., A. Wieckowska, et al. (2009). "Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study." Hepatology **50**(4): 1072-8.

Festi, D., R. Schiumerini, et al. (2013). "Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease -- availability and accuracy of non-invasive methods." Aliment Pharmacol Ther **37**(4): 392-400.

Foucher, J., E. Chanteloup, et al. (2006). "Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study." Gut **55**(3): 403-8.

Fraquelli, M., C. Rigamonti, et al. (2007). "Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease." Gut **56**(7): 968-73.

Friedrich-Rust, M., H. Hadji-Hosseini, et al. (2010). "Transient elastography with a new probe for obese patients for non-invasive staging of non-alcoholic steatohepatitis." Eur Radiol **20**(10): 2390-6.

Friedrich-Rust, M., M. F. Ong, et al. (2008). "Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis." Gastroenterology **134**(4): 960-74.

Frith, J., C. P. Day, et al. (2009). "Non-alcoholic fatty liver disease in older people." Gerontology **55**(6): 607-13.

Froehlich, F., O. Lamy, et al. (1993). "Practice and complications of liver biopsy. Results of a nationwide survey in Switzerland." Dig Dis Sci **38**(8): 1480-4.

Fukusato, T., J. Fukushima, et al. (2005). "Interobserver variation in the histopathological assessment of nonalcoholic steatohepatitis." Hepatol Res **33**(2): 122-7.

Fung, J., C. L. Lai, et al. (2010). "Correlation of liver stiffness and histological features in healthy persons and in patients with occult hepatitis B, chronic active hepatitis B, or hepatitis B cirrhosis." Am J Gastroenterol **105**(5): 1116-22.

Fung, J., C. L. Lai, et al. (2011). "Mild-to-moderate elevation of alanine aminotransferase increases liver stiffness measurement by transient elastography in patients with chronic hepatitis B." Am J Gastroenterol **106**(3): 492-6.

Fung, J., C. L. Lai, et al. "Significant changes in liver stiffness measurements in patients with chronic hepatitis B: 3-year follow-up study." J Viral Hepat **18**(7): e200-5.

Fung, J., C. L. Lai, et al. (2011). "Significant changes in liver stiffness measurements in patients with chronic hepatitis B: 3-year follow-up study." J Viral Hepat **18**(7): e200-5.

Garcia-Tsao, G. and J. L. Boyer (1993). "Outpatient liver biopsy: how safe is it?" Ann Intern Med **118**(2): 150-3.

Garcia-Tsao, G., S. Friedman, et al. (2010). "Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis." Hepatology **51**(4): 1445-9.

Gastaldelli, A. (2010). "Fatty liver disease: the hepatic manifestation of metabolic syndrome." Hypertens Res **33**(6): 546-7.
Gastaldelli, A., M. Kozakova, et al. (2009). "Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population." Hepatology **49**(5): 1537-44.
Gawrieh, S., D. M. Knoedler, et al. "Effects of interventions on intra- and interobserver agreement on interpretation of nonalcoholic fatty liver disease histology." Ann Diagn Pathol **15**(1): 19-24.
Gilmore, I. T., A. Burroughs, et al. (1995). "Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London." Gut **36**(3): 437-41.
Goel, A., M. Gupta, et al. (2014). "Gut microbiota and liver disease." J Gastroenterol Hepatol.
Goldstein, N. S., F. Hastah, et al. (2005). "Fibrosis heterogeneity in nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C virus needle core biopsy specimens." Am J Clin Pathol **123**(3): 382-7.
Goossens, N. and F. Negro (2013). "Is the genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain?" Hepatology.
Graif, M., M. Yanuka, et al. (2000). "Quantitative estimation of attenuation in ultrasound video images: correlation with histology in diffuse liver disease." Invest Radiol **35**(5): 319-24.
Guerrero-Romero, F., L. E. Simental-Mendia, et al. (2010). "The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp." J Clin Endocrinol Metab **95**(7): 3347-51.
Guha, I. N., J. Parkes, et al. (2008). "Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers." Hepatology **47**(2): 455-60.
Guiu, B., E. Crevisy-Girod, et al. (2012). "Prediction for steatosis in type-2 diabetes: clinico-biological markers versus 1H-MR spectroscopy." Eur Radiol **22**(4): 855-63.
Hamaguchi, M., T. Kojima, et al. (2005). "The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease." Ann Intern Med **143**(10): 722-8.
Harrison, S. A., D. Oliver, et al. (2008). "Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease." Gut **57**(10): 1441-7.
Hezode, C., L. Castera, et al. "Liver stiffness diminishes with antiviral response in chronic hepatitis C." Aliment Pharmacol Ther **34**(6): 656-63.
Hezode, C., L. Castera, et al. (2011). "Liver stiffness diminishes with antiviral response in chronic hepatitis C." Aliment Pharmacol Ther **34**(6): 656-63.
Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." J Clin Invest **95**(5): 2409-15.
Hui, J. M., A. Hodge, et al. (2004). "Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?" Hepatology **40**(1): 46-54.
Ingiliz, P., K. P. Chhay, et al. (2009). "Applicability and variability of liver stiffness measurements according to probe position." World J Gastroenterol **15**(27): 3398-404.
Janiec, D. J., E. R. Jacobson, et al. (2005). "Histologic variation of grade and stage of non-alcoholic fatty liver disease in liver biopsies." Obes Surg **15**(4): 497-501.
Jarrar, M. H., A. Baranova, et al. (2008). "Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease." Aliment Pharmacol Ther **27**(5): 412-21.
Jou, J., S. S. Choi, et al. (2008). "Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease." Semin Liver Dis **28**(4): 370-9.

Jung, K. S., S. U. Kim, et al. (2011). "Risk assessment of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development using liver stiffness measurement (FibroScan)." Hepatology **53**(3): 885-94.
Kahl, S., K. Strassburger, et al. (2014). "Comparison of liver fat indices for the diagnosis of hepatic steatosis and insulin resistance." PLoS One **9**(4): e94059.
Kahn, H. S. (2005). "The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison." BMC Cardiovasc Disord **5**: 26.
Kahn, H. S. (2006). "The lipid accumulation product is better than BMI for identifying diabetes: a population-based comparison." Diabetes Care **29**(1): 151-3.
Kazemi, F., A. Kettaneh, et al. (2006). "Liver stiffness measurement selects patients with cirrhosis at risk of bearing large oesophageal varices." J Hepatol **45**(2): 230-5.
Kim, B. K., J. Fung, et al. "Clinical application of liver stiffness measurement using transient elastography in chronic liver disease from longitudinal perspectives." World J Gastroenterol **19**(12): 1890-900.
Kim, B. K., J. Fung, et al. (2013). "Clinical application of liver stiffness measurement using transient elastography in chronic liver disease from longitudinal perspectives." World J Gastroenterol **19**(12): 1890-900.
Kim, D., S.-Y. Choi, et al. (2012). "Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcification." Hepatology **56**(2): 605-613.
Kim, J. H., S. Y. Kwon, et al. (2011). "Validation of fatty liver index and lipid accumulation product for predicting fatty liver in Korean population." Liver Int **31**(10): 1600-1.
Kim, K. M., W. B. Choi, et al. (2007). "Diagnosis of hepatic steatosis and fibrosis by transient elastography in asymptomatic healthy individuals: a prospective study of living related potential liver donors." J Gastroenterol **42**(5): 382-8.
Kim, S. U., J. H. Lee, et al. (2012). "Prediction of liver-related events using fibroscan in chronic hepatitis B patients showing advanced liver fibrosis." PLoS One **7**(5): e36676.
Kim, S. U., J. Y. Park, et al. "Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression." Hepatol Int **4**(4): 673-80.
Kim, S. U., J. Y. Park, et al. (2010). "Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression." Hepatol Int **4**(4): 673-80.
Kleiner, D. E. and E. M. Brunt "Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research." Semin Liver Dis **32**(1): 3-13.
Kleiner, D. E., E. M. Brunt, et al. (2005). "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **41**(6): 1313-21.
Kneeman, J. M., J. Misdraji, et al. (2012). "Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease." Therap Adv Gastroenterol **5**(3): 199-207.
Kotronen, A., M. Peltonen, et al. (2009). "Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors." Gastroenterology **137**(3): 865-72.
Kotronen, A., J. Westerbacka, et al. (2007). "Liver fat in the metabolic syndrome." J Clin Endocrinol Metab **92**(9): 3490-7.
Kunde, S. S., A. J. Lazenby, et al. (2005). "Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women." Hepatology **42**(3): 650-6.
Lafontan, M. and N. Viguerie (2006). "Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin." Curr Opin Pharmacol **6**(6): 580-5.

Lambert, J., P. Halfon, et al. (2008). "How to measure the diagnostic accuracy of noninvasive liver fibrosis indices: the area under the ROC curve revisited." Clin Chem **54**(8): 1372-8.
Larson, S. P., S. P. Bowers, et al. (2007). "Histopathologic variability between the right and left lobes of the liver in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y bypass." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(11): 1329-32.
Lebray, P., S. Varnous, et al. (2008). "Liver stiffness is an unreliable marker of liver fibrosis in patients with cardiac insufficiency." Hepatology **48**(6): 2089.
Lebrec, D., G. Goldfarb, et al. (1982). "Transvenous liver biopsy: an experience based on 1000 hepatic tissue samplings with this procedure." Gastroenterology **83**(2): 338-40.
Lee, J. H., D. Kim, et al. (2010). "Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease." Dig Liver Dis **42**(7): 503-8.
Lee, S. H., H. S. Kwon, et al. (2014). "Predicting the development of diabetes using the product of triglycerides and glucose: the Chungju Metabolic Disease Cohort (CMC) study." PLoS One **9**(2): e90430.
Lee, S. W., S. H. Park, et al. (2007). "Unenhanced CT for assessment of macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: comparison of visual grading with liver attenuation index." Radiology **244**(2): 479-85.
Lemoine, M., S. Katsahian, et al. (2008). "Liver stiffness measurement as a predictive tool of clinically significant portal hypertension in patients with compensated hepatitis C virus or alcohol-related cirrhosis." Aliment Pharmacol Ther **28**(9): 1102-10.
Lemoine, M., V. Ratziu, et al. (2009). "Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease." Liver Int **29**(9): 1431-8.
Lerchbaum, E., H. J. Gruber, et al. (2011). "Fatty liver index in polycystic ovary syndrome." Eur J Endocrinol **165**(6): 935-43.
Lerchbaum, E., H. J. Gruber, et al. (2011). "Fatty liver index in polycystic ovary syndrome." European Journal of Endocrinology **165**(6): 935-943.
Lerchbaum, E., S. Pilz, et al. (2013). "The fatty liver index is associated with increased mortality in subjects referred to coronary angiography." Nutr Metab Cardiovasc Dis **23**(12): 1231-8.
Lerchbaum, E., S. Pilz, et al. (2013). "The fatty liver index is associated with increased mortality in subjects referred to coronary angiography." Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **23**(12): 1231-1238.
Liangpunsakul, S. and N. Chalasani (2012). "What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use?" Am J Gastroenterol **107**(7): 976-8.
Liou, I. W. (2014). "Management of end-stage liver disease." Med Clin North Am **98**(1): 119-52.
Listenberger, L. L., X. Han, et al. (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3077-82.
Loria, P., L. Carulli, et al. (2009). "Endocrine and liver interaction: the role of endocrine pathways in NASH." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(4): 236-47.
Loria, P., A. Lonardo, et al. (2003). "Non-organ-specific autoantibodies in nonalcoholic fatty liver disease: prevalence and correlates." Dig Dis Sci **48**(11): 2173-81.
Lucidarme, D., J. Foucher, et al. (2009). "Factors of accuracy of transient elastography (fibroscan) for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C." Hepatology **49**(4): 1083-9.
Ludwig, J., T. R. Viggiano, et al. (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." Mayo Clin Proc **55**(7): 434-8.

M'Kada, H., M. Munteanu, et al. (2011). "What are the best reference values for a normal serum alanine transaminase activity (ALT)? Impact on the presumed prevalence of drug induced liver injury (DILI)." Regul Toxicol Pharmacol **60**(3): 290-5.
Machado, M., P. Marques-Vidal, et al. (2006). "Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery." J Hepatol **45**(4): 600-6.
Machado, M. V. and H. Cortez-Pinto (2013). "Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal." J Hepatol **58**(5): 1007-19.
Malik, R., M. Lai, et al. (2010). "Comparison of transient elastography, serum markers and clinical signs for the diagnosis of compensated cirrhosis." J Gastroenterol Hepatol **25**(9): 1562-8.
Marcellin, P., M. Ziol, et al. (2009). "Non-invasive assessment of liver fibrosis by stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B." Liver Int **29**(2): 242-7.
Marchesini, G., M. Brizi, et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome." Diabetes **50**(8): 1844-50.
Marchesini, G., M. Brizi, et al. (1999). "Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance." Am J Med **107**(5): 450-5.
Marchesini, G., E. Bugianesi, et al. (2003). "Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome." Hepatology **37**(4): 917-23.
Martinez, S. M., J. Foucher, et al. "Longitudinal liver stiffness assessment in patients with chronic hepatitis C undergoing antiviral therapy." PLoS One **7**(10): e47715.
Martinez, S. M., J. Foucher, et al. (2012). "Longitudinal liver stiffness assessment in patients with chronic hepatitis C undergoing antiviral therapy." PLoS One **7**(10): e47715.
Masuzaki, R., R. Tateishi, et al. (2009). "Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography." Hepatology **49**(6): 1954-61.
Matteoni, C. A., Z. M. Younossi, et al. (1999). "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity." Gastroenterology **116**(6): 1413-9.
Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.
McCullough, A. J. (2004). "The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease." Clin Liver Dis **8**(3): 521-33, viii.
McGill, D. B., J. Rakela, et al. (1990). "A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy." Gastroenterology **99**(5): 1396-400.
McPherson, S., J. R. Jonsson, et al. (2009). "Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered." J Hepatol **51**(2): 389-97.
McPherson, S., S. F. Stewart, et al. (2010). "Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Gut **59**(9): 1265-9.
Mederacke, I., K. Wursthorn, et al. (2009). "Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection." Liver Int **29**(10): 1500-6.
Menghini, G. (1957). "[Effective advance in the technic of puncture biopsy of the liver]." Rass Fisiopatol Clin Ter **29**(7): 756-73.
Merriman, R. B., L. D. Ferrell, et al. (2006). "Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **44**(4): 874-80.
Miele, L., V. Valenza, et al. (2009). "Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **49**(6): 1877-87.

Millonig, G., F. M. Reimann, et al. (2008). "Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis." Hepatology **48**(5): 1718-23.
Minervini, M. I., K. Ruppert, et al. (2009). "Liver biopsy findings from healthy potential living liver donors: reasons for disqualification, silent diseases and correlation with liver injury tests." J Hepatol **50**(3): 501-10.
Mofrad, P., M. J. Contos, et al. (2003). "Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values." Hepatology **37**(6): 1286-92.
Mottin, C. C., M. Moretto, et al. (2004). "The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients." Obes Surg **14**(5): 635-7.
Musso, G., M. Cassader, et al. (2012). "Diagnostic accuracy of adipose insulin resistance index and visceral adiposity index for progressive liver histology and cardiovascular risk in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **56**(2): 788-9.
Musso, G., R. Gambino, et al. (2011). "Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity." Ann Med **43**(8): 617-49.
Musso, G., R. Gambino, et al. (2003). "Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **37**(4): 909-16.
Musso, G., R. Gambino, et al. (2005). "Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease." Hepatology **42**(5): 1175-83.
Myers, R. P., P. Crotty, et al. (2010). "Prevalence, risk factors and causes of discordance in fibrosis staging by transient elastography and liver biopsy." Liver Int **30**(10): 1471-80.
Myers, R. P., G. Pomier-Layrargues, et al. (2012). "Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients." Hepatology **55**(1): 199-208.
Nadalin, S., M. Malago, et al. (2005). "Preoperative donor liver biopsy for adult living donor liver transplantation: risks and benefits." Liver Transpl **11**(8): 980-6.
Neukam, K., E. Recio, et al. (2010). "Interobserver concordance in the assessment of liver fibrosis in HIV/HCV-coinfected patients using transient elastometry." Eur J Gastroenterol Hepatol **22**(7): 801-7.
Neuschwander-Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003). "Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference." Hepatology **37**(5): 1202-19.
Newton, J. L., D. E. Jones, et al. (2008). "Fatigue in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is significant and associates with inactivity and excessive daytime sleepiness but not with liver disease severity or insulin resistance." Gut **57**(6): 807-13.
Nobili, V., J. Parkes, et al. (2009). "Performance of ELF serum markers in predicting fibrosis stage in pediatric non-alcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **136**(1): 160-7.
Obuchowski, N. A. (2006). "An ROC-type measure of diagnostic accuracy when the gold standard is continuous-scale." Stat Med **25**(3): 481-93.
Oh, J. Y., Y. A. Sung, et al. (2013). "The visceral adiposity index as a predictor of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome." Obesity (Silver Spring) **21**(8): 1690-4.
Osawa, H. and Y. Mori (1996). "Sonographic diagnosis of fatty liver using a histogram technique that compares liver and renal cortical echo amplitudes." J Clin Ultrasound **24**(1): 25-9.
Palekar, N. A., R. Naus, et al. (2006). "Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease." Liver Int **26**(2): 151-6.
Palmentieri, B., I. de Sio, et al. (2006). "The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis." Dig Liver Dis **38**(7): 485-9.

Park, G. J., E. Wiseman, et al. (2011). "Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the 13 C-caffeine breath test." J Gastroenterol Hepatol **26**(9): 1411-6.
Park, S. H., P. N. Kim, et al. (2006). "Macrovesicular hepatic steatosis in living liver donors: use of CT for quantitative and qualitative assessment." Radiology **239**(1): 105-12.
Park, S. K., M. H. Seo, et al. (2013). "Clinical availability of nonalcoholic fatty liver disease as an early predictor of type 2 diabetes mellitus in korean men: 5-year prospective cohort study." Hepatology **57**(4): 1378-1383.
Perazzo, H., F. F. Fernandes, et al. (2014). "Interobserver variability in transient elastography analysis of patients with chronic hepatitis C." Liver Int.
Perrault, J., D. B. McGill, et al. (1978). "Liver biopsy: complications in 1000 inpatients and outpatients." Gastroenterology **74**(1): 103-6.
Petersen, K. F., S. Dufour, et al. (2005). "Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes." Diabetes **54**(3): 603-8.
Petta, S., M. Amato, et al. (2010). "Visceral adiposity index is associated with histological findings and high viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1." Hepatology **52**(5): 1543-52.
Petta, S., M. C. Amato, et al. (2012). "Visceral adiposity index is associated with significant fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Aliment Pharmacol Ther **35**(2): 238-47.
Petta, S., V. Di Marco, et al. (2011). "TyG index, HOMA score and viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1." J Viral Hepat **18**(7): e372-80.
Piccinino, F., E. Sagnelli, et al. (1986). "Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies." J Hepatol **2**(2): 165-73.
Piton, A., T. Poynard, et al. (1998). "Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group." Hepatology **27**(5): 1213-9.
Powell, E. E., W. G. Cooksley, et al. (1990). "The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years." Hepatology **11**(1): 74-80.
Poynard, T., V. de Ledinghen, et al. (2011). "FibroTest and Fibroscan performances revisited in patients with chronic hepatitis C. Impact of the spectrum effect and the applicability rate." Clin Res Hepatol Gastroenterol **35**(11): 720-30.
Poynard, T., P. Halfon, et al. (2007). "Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages." Clin Chem **53**(9): 1615-22.
Poynard, T., P. Ingiliz, et al. (2008). "Concordance in a world without a gold standard: a new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers." PLoS One **3**(12): e3857.
Poynard, T., G. Lassailly, et al. (2012). "Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data." PLoS One **7**(3): e30325.
Poynard, T., M. Munteanu, et al. (2011). "Applicability and precautions of use of liver injury biomarker FibroTest. A reappraisal at 7 years of age." BMC Gastroenterol **11**: 39.
Poynard, T., M. Muntenau, et al. (2008). "Methodological aspects of the interpretation of non-invasive biomarkers of liver fibrosis: a 2008 update." Gastroenterol Clin Biol **32**(6 Suppl 1): 8-21.

Poynard, T., Y. Ngo, et al. (2011). "Noninvasive Markers of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B." Curr Hepat Rep **10**(2): 87-97.
Poynard, T., V. Ratziu, et al. (2006). "Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholo steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." BMC Gastroenterol **6**: 34.
Poynard, T., V. Ratziu, et al. (2005). "The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis." Comp Hepatol **4**: 10.
Poynard, T., J. Vergniol, et al. (2013). "Staging chronic hepatitis C in seven categories using fibrosis biomarker (FibroTest) and transient elastography (FibroScan)." J Hepatol.
Pratt, D. S. and M. M. Kaplan (2000). "Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients." N Engl J Med **342**(17): 1266-71.
Pritchett, S., A. Cardenas, et al. (2011). "The optimal cut-off for predicting large oesophageal varices using transient elastography is disease specific." J Viral Hepat **18**(4): e75-80.
Qureshi, K., R. H. Clements, et al. (2008). "The utility of the "NAFLD fibrosis score" in morbidly obese subjects with NAFLD." Obes Surg **18**(3): 264-70.
Rabe, K., M. Lehrke, et al. (2008). "Adipokines and insulin resistance." Mol Med **14**(11-12): 741-51.
Ratziu, V., S. Bellentani, et al. (2010). "A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference." J Hepatol **53**(2): 372-84.
Ratziu, V., L. Bonyhay, et al. (2002). "Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis." Hepatology **35**(6): 1485-93.
Ratziu, V., E. Bugianesi, et al. (2007). "Histological progression of non-alcoholic fatty liver disease: a critical reassessment based on liver sampling variability." Aliment Pharmacol Ther **26**(6): 821-30.
Ratziu, V., F. Charlotte, et al. (2005). "Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **128**(7): 1898-906.
Ratziu, V., P. Giral, et al. (2000). "Liver fibrosis in overweight patients." Gastroenterology **118**(6): 1117-23.
Ratziu, V., P. Giral, et al. (2007). "Screening for liver disease using non-invasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest and NashTest) in patients with hyperlipidaemia." Aliment Pharmacol Ther **25**(2): 207-18.
Ratziu, V., J. Massard, et al. (2006). "Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." BMC Gastroenterol **6**: 6.
Recio, E., C. Cifuentes, et al. (2013). "Interobserver concordance in controlled attenuation parameter measurement, a novel tool for the assessment of hepatic steatosis on the basis of transient elastography." Eur J Gastroenterol Hepatol **25**(8): 905-11.
Ripoll, C., R. Groszmann, et al. (2007). "Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis." Gastroenterology **133**(2): 481-8.
Robic, M. A., B. Procopet, et al. (2011). "Liver stiffness accurately predicts portal hypertension related complications in patients with chronic liver disease: a prospective study." J Hepatol **55**(5): 1017-24.
Roca, B., E. Resino, et al. (2012). "Interobserver discrepancy in liver fibrosis using transient elastography." J Viral Hepat **19**(10): 711-5.
Rosenberg, W. M., M. Voelker, et al. (2004). "Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study." Gastroenterology **127**(6): 1704-13.
Roulot, D., S. Czernichow, et al. (2008). "Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome." J Hepatol **48**(4): 606-13.

Ryan, C. K., L. A. Johnson, et al. (2002). "One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation." Liver Transpl **8**(12): 1114-22.

Ryysy, L., A. M. Hakkinen, et al. (2000). "Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients." Diabetes **49**(5): 749-58.

Saadeh, S., Z. M. Younossi, et al. (2002). "The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **123**(3): 745-50.

Saadeh, S., Z. M. Younossi, et al. (2002). "The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **123**(3): 745-50.

Sagir, A., A. Erhardt, et al. (2008). "Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage." Hepatology **47**(2): 592-5.

Sanchez-Conde, M., M. L. Montes-Ramirez, et al. (2010). "Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers." J Viral Hepat **17**(4): 280-6.

Sandrin, L., B. Fourquet, et al. (2003). "Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis." Ultrasound Med Biol **29**(12): 1705-13.

Sanyal, A. J., C. Banas, et al. (2006). "Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C." Hepatology **43**(4): 682-9.

Sanyal, A. J., E. M. Brunt, et al. (2011). "Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **54**(1): 344-53.

Sasso, M., M. Beaugrand, et al. (2010). "Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes." Ultrasound Med Biol **36**(11): 1825-35.

Saverymuttu, S. H., A. E. Joseph, et al. (1986). "Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis." Br Med J (Clin Res Ed) **292**(6512): 13-5.

Schmilovitz-Weiss, H., Y. Niv, et al. (2008). "The 13C-caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis." J Clin Gastroenterol **42**(4): 408-12.

Schwimmer, J. B., M. A. Celedon, et al. (2009). "Heritability of nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **136**(5): 1585-92.

Setji, T. L., N. D. Holland, et al. (2006). "Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **91**(5): 1741-7.

Simental-Mendia, L. E., M. Rodriguez-Moran, et al. (2008). "The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects." Metab Syndr Relat Disord **6**(4): 299-304.

Singh, S., L. L. Fujii, et al. (2013). "Liver Stiffness Is Associated With Risk of Decompensation, Liver Cancer, and Death in Patients With Chronic Liver Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis." Clin Gastroenterol Hepatol **11**(12): 1573-1584 e2.

Smith, B. W. and L. A. Adams (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease." Crit Rev Clin Lab Sci **48**(3): 97-113.

Soderberg, C., P. Stal, et al. (2010). "Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up." Hepatology **51**(2): 595-602.

Starley, B. Q., C. J. Calcagno, et al. "Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection." Hepatology **51**(5): 1820-32.

Strauss, S., E. Gavish, et al. (2007). "Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver." AJR Am J Roentgenol **189**(6): W320-3.

Sung, K.-C., S. H. Wild, et al. (2014). "Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension." Journal of Hepatology **60**(5): 1040-1045.

Suzuki, A., J. Lymp, et al. (2006). "Values and limitations of serum aminotransferases in clinical trials of nonalcoholic steatohepatitis." Liver Int **26**(10): 1209-16.

Szczepaniak, L. S., P. Nurenberg, et al. (2005). "Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(2): E462-8.

Tandra, S., M. M. Yeh, et al. "Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease." J Hepatol **55**(3): 654-9.

Targher, G., L. Bertolini, et al. (2007). "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients." Diabetes Care **30**(5): 1212-8.

Targher, G., L. Bertolini, et al. (2006). "Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease." Clin Endocrinol (Oxf) **64**(6): 679-83.

Targher, G., C. P. Day, et al. (2010). "Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease." N Engl J Med **363**(14): 1341-50.

Teli, M. R., O. F. James, et al. (1995). "The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study." Hepatology **22**(6): 1714-9.

Thabut, D., G. D'Amico, et al. (2010). "Diagnostic performance of Baveno IV criteria in cirrhotic patients with upper gastrointestinal bleeding: analysis of the F7 liver-1288 study population." J Hepatol **53**(6): 1029-34.

Tran, T. T., C. Changsri, et al. (2006). "Living donor liver transplantation: histological abnormalities found on liver biopsies of apparently healthy potential donors." J Gastroenterol Hepatol **21**(2): 381-3.

Treeprasertsuk, S., E. Bjornsson, et al. (2013). "NAFLD fibrosis score: a prognostic predictor for mortality and liver complications among NAFLD patients." World J Gastroenterol **19**(8): 1219-29.

Trifan, A., C. Sfarti, et al. (2011). "Increased liver stiffness in extrahepatic cholestasis caused by choledocholithiasis." Hepat Mon **11**(5): 372-5.

Vallet-Pichard, A., V. Mallet, et al. (2007). "FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest." Hepatology **46**(1): 32-6.

van der Poorten, D., K. L. Milner, et al. (2008). "Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease." Hepatology **48**(2): 449-57.

Vanni, E., E. Bugianesi, et al. (2010). "From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa?" Dig Liver Dis **42**(5): 320-30.

Vasques, A. C., F. S. Novaes, et al. (2011). "TyG index performs better than HOMA in a Brazilian population: a hyperglycemic clamp validated study." Diabetes Res Clin Pract **93**(3): e98-e100.

Vergara, S., J. Macias, et al. (2007). "The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection." Clin Infect Dis **45**(8): 969-74.

Vergniol, J., J. Foucher, et al. (2009). "Changes of non-invasive markers and FibroScan values during HCV treatment." J Viral Hepat **16**(2): 132-40.

Vergniol, J., J. Foucher, et al. (2011). "Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C." Gastroenterology **140**(7): 1970-9, 1979 e1-3.
Vernon, G., A. Baranova, et al. (2011). "Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults." Aliment Pharmacol Ther **34**(3): 274-85.
Videla, L. A., G. Tapia, et al. (2009). "Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients." Obesity (Silver Spring) **17**(5): 973-9.
Villanova, N., S. Moscatiello, et al. (2005). "Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **42**(2): 473-80.
Vispo, E., P. Barreiro, et al. (2009). "Overestimation of liver fibrosis staging using transient elastography in patients with chronic hepatitis C and significant liver inflammation." Antivir Ther **14**(2): 187-93.
Vizzutti, F., U. Arena, et al. (2007). "Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis." Hepatology **45**(5): 1290-7.
Volzke, H., D. M. Robinson, et al. (2005). "Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis." World J Gastroenterol **11**(12): 1848-53.
Vongsuvanh, R., J. George, et al. (2012). "Visceral adiposity index is not a predictor of liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol **57**(2): 392-8.
Vuppalanchi, R. and N. Chalasani (2009). "Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management." Hepatology **49**(1): 306-17.
Vuppalanchi, R., S. Marri, et al. (2005). "Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study." J Clin Gastroenterol **39**(3): 237-42.
Vuppalanchi, R., A. Unalp, et al. (2009). "Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(4): 481-6.
Wagenknecht, L. E., A. L. Scherzinger, et al. (2009). "Correlates and heritability of nonalcoholic fatty liver disease in a minority cohort." Obesity (Silver Spring) **17**(6): 1240-6.
Weston, S. R., W. Leyden, et al. (2005). "Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease." Hepatology **41**(2): 372-9.
Wieckowska, A., N. N. Zein, et al. (2006). "In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **44**(1): 27-33.
Williams, C. D., J. Stengel, et al. (2011). "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study." Gastroenterology **140**(1): 124-31.
Williamson, R. M., J. F. Price, et al. (2011). "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study." Diabetes Care **34**(5): 1139-44.
Wlazlo, N., M. M. van Greevenbroek, et al. (2012). "The diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease." Aliment Pharmacol Ther **35**(1): 204-5; author reply 205-6.
Wong, G. L. "Transient elastography: Kill two birds with one stone?" World J Hepatol **5**(5): 264-74.
Wong, G. L. (2013). "Transient elastography: Kill two birds with one stone?" World J Hepatol **5**(5): 264-74.

Wong, G. L., V. W. Wong, et al. (2009). "Increased liver stiffness measurement by transient elastography in severe acute exacerbation of chronic hepatitis B." J Gastroenterol Hepatol **24**(6): 1002-7.
Wong, V. W., J. Vergniol, et al. (2012). "Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease." Am J Gastroenterol **107**(12): 1862-71.
Wong, V. W., J. Vergniol, et al. (2010). "Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **51**(2): 454-62.
Wong, V. W., G. L. Wong, et al. (2010). "Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years." Gut **59**(7): 969-74.
Wong, V. W., G. L. Wong, et al. (2011). "Coronary artery disease and cardiovascular outcomes in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Gut **60**(12): 1721-7.
Wu, J., J. You, et al. (2012). "Prevalence of liver steatosis and fibrosis and the diagnostic accuracy of ultrasound in bariatric surgery patients." Obes Surg **22**(2): 240-7.
Xu, A., Y. Wang, et al. (2003). "The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice." J Clin Invest **112**(1): 91-100.
Yamaguchi, K., L. Yang, et al. (2007). "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **45**(6): 1366-74.
Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-95.
Yan, E., F. Durazo, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, identification, progression, and management." Nutr Rev **65**(8 Pt 1): 376-84.
Younossi, Z. M., T. Gramlich, et al. (1998). "Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations." Mod Pathol **11**(6): 560-5.
Younossi, Z. M., M. Jarrar, et al. (2008). "A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH)." Obes Surg **18**(11): 1430-7.
Younossi, Z. M., S. Page, et al. (2011). "A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis." Obes Surg **21**(4): 431-9.
Younossi, Z. M., M. Stepanova, et al. "Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality." Hepatology **53**(6): 1874-82.
Zelber-Sagi, S., D. Nitzan-Kaluski, et al. (2008). "Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study." Hepatology **48**(6): 1791-8.
Ziol, M., A. Handra-Luca, et al. (2005). "Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C." Hepatology **41**(1): 48-54.

Chapitre X . Article annexe :

Clinics and Research in Hepathology and Gastroenterology (2011) 35, 23–28

Available online at ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE

Progression from isolated steatosis to steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease

R. Pais[a], A. Pascale[a], L. Fedchuck[a], F. Charlotte[b], T. Poynard[a], V. Ratziu[a,*,c]

[a] Service d'hépatogastroentérologie, hôpital Pitié Salpêtrière, Assistance publique Hôpitaux de Paris, université Pierre-et-Marie-Curie, 47, boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France
[b] Laboratoire d'anatomie pathologique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, université Pierre-et-Marie-Curie, 47, boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France
[c] Inserm UMRS_893, hôpital Pitié-Salpêtrière, CdR Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Available online 23 December 2010

Summary In patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) isolated steatosis is considered a benign condition with no or minimal rate of progression, in contrast to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) which can progress to cirrhosis. We report on a series of six patients with isolated steatosis on an initial liver biopsy, and NASH on a follow-up biopsy performed five years after. All but one of the initial biopsies were longer than 15 mm. At follow-up, inflammation and ballooning were present in all patients and mild fibrosis in three. All patients had one or more features of metabolic syndrome at baseline. Progression to steatohepatitis occurred independent of aminotransferase changes. Five patients experienced an increase in one or several metabolic risk factors during follow-up: body mass index, triglyceride levels, arterial hypertension and/or the HOMA index. One patient did not exhibit progression but was still exposed to metabolic risks factors at the end of follow-up. This report demonstrates that isolated steatosis is not necessarily a benign, non-progressive condition. Current recommendations for the absence of hepatic monitoring in patients with isolated steatosis are not adequate. If metabolic risk factors persist or deteriorate during follow-up and/or non-invasive markers suggest disease progression, a control liver biopsy should be considered.
© 2010 Published by Elsevier Masson SAS.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common conditions in hepatology, mainly due to the current increase in the prevalence of obesity and diabetes and to a Western-type of lifestyle and diet [1]. There are two pathological forms of NAFLD: bland steatosis and steatohepatitis (NASH). The current understanding of the natural history of NAFLD is that these entities have a strikingly different prognosis. Several studies with long-term follow-up are available showing that bland steatosis is not associated with an increase in liver-related mortality [2–5]. A systematic review of risk factors for disease progression in NAFLD has identified the presence of necroinflammatory activity as the most important predictor of fibrosis progression [2], therefore placing the patients with steatosis only at low or no risk of fibrosis progression. In contrast, steatohepatitis is associated with a ten-fold increase in liver-related mortality [5,7]. Because of the necroinflammatory component defining steatohepatitis, this condition is at risk of fibrotic

* Corresponding author.
E-mail address: vratziu@teaser.fr (V. Ratziu).

0399-8320/$ - see front matter © 2010 Published by Elsevier Masson SAS.
doi:10.1016/j.gcb.2010.06.004

progression; this can result in cirrhosis, an independent cause of death in several studies performed in different settings [3–5]. Therefore, the current view is that patients with steatosis should be reassured regarding the potential of progression of their liver disease and monitoring should focus on the extrahepatic complications of liver fat. There are very few reports documenting the progression of steatosis to steatohepatitis [6,7] and they mostly concern patients with a histological diagnosis made before the implementation of the current, widely accepted histological classifications of NAFLD [8]. Herein, we report on a case series of six patients with isolated steatosis due to NAFLD that progressed to steatohepatitis despite the absence of inflammation or liver cell injury on the initial biopsy. These observations might signal a shift in our understanding of the natural history of NAFLD and provide reasons for change in current monitoring strategies.

Patients and methods

We reviewed the records of six patients (four men) who had been initially diagnosed with bland steatosis related to primary NAFLD seen in a tertiary referral center between 1998 and 2009 and who had undergone a follow-up liver biopsy more than one year after the index biopsy. At the baseline evaluation, other causes of liver disease were ruled out in these patients:

- daily alcohol consumption greater than 30 g for men and 20 g for women;
- drug-induced hepatotoxicity;
- infection with HBV or HCV viruses;
- genetic hemochromatosis;
- autoimmune liver disease including autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis;
- α1-antitrypsin deficiency;
- Wilson's disease;
- abnormal serum thyroid hormone levels.

All patients were evaluated at baseline and the end of follow-up for metabolic risk factors: obesity, diabetes, insulin resistance (HOMA-IR index), hypertension and dyslipidemia. Transaminase levels were recorded at baseline and at the end of follow-up.

Patients were selected based on the absence of an intake of drugs that could induce steatohepatitis (corticosteroids, amiodarone or tamoxifen), or drugs that could impact on the biochemical or histological features of NAFLD (ursodesoxycholic acid or glitazones).

The second biopsy was indicated because of persistent alanine aminotranferase (ALT) elevation coexisting with the persistence of the metabolic risk factors and/or because of progression of the metabolic comorbidities (in all except one patient). In three patients (patients 3, 4 and 5), the biopsy was repeated because the patients were considered for inclusion in a therapeutic trial (rosiglitazone or high dose ursodesoxycholic acid). Both the index and the follow-up liver biopsy were read and scored by the same pathologist in all six patients using the Kleiner-Brunt histological classification [8]. All core liver biopsies were obtained by transparietal biopsy.

Patient characteristics at baseline and follow-up

The clinical and biological characteristics of the individual patients are presented in Table 1. The median body mass index (BMI) was 27 kg/m^2 (range from 22.5 to 31.6) at baseline; only one patient had grade I obesity, four other patients had overweight, and one patient had a normal weight. The median ALT was 61 IU/l (range from 30 to 114 IU/l); the median serum glucose, fasting insulin and HOMA levels were 5.28 mmol/l (range from 5.1 to 5.6 mmol/l), 10.85 μIU/ml (range from 5 to 30 μIU/l) and 2.57 (range from 1.17 to 7.06), respectively.

During follow-up, the BMI increased by a mean of 2.33 kg/m^2 in two patients, remained stable in three and decreased by 1 kg/m^2 in one. Overall, overweight and obesity were still present in all except one patient at the end of follow up. None of the six patients had type 2 diabetes at baseline or at the end of follow-up, but three patients had hyperinsulinemia and insulin resistance at baseline. The HOMA-IR index decreased in two patients, but insulin resistance (HOMA-IR index > 2) was still present in four of the six patients.

Arterial hypertension (HTN) was present in two patients at baseline and progressed in one patient at the end of follow-up. One patient had type IIb dysplipidemia at the baseline. Dyslipidemia progressed in one patient and regressed in two others.

Aminotransferase levels did not change significantly between baseline and follow-up (median values of 39.5 vs 40 IU/ml, respectively, for aspartate aminotransfersase (AST), and 61 vs 50 IU/ml, respectively, for ALT) (Fig. 1).

Histological progression

The median interval between the two biopsies was five years (range two to ten years). The median sample size was 18.5 mm (range 13 to 25 mm) and 26 mm (range 10 to 33 mm) for the initial and follow-up biopsies, respectively, with a median number of portal tracts of 12.5 (range 6–16) and

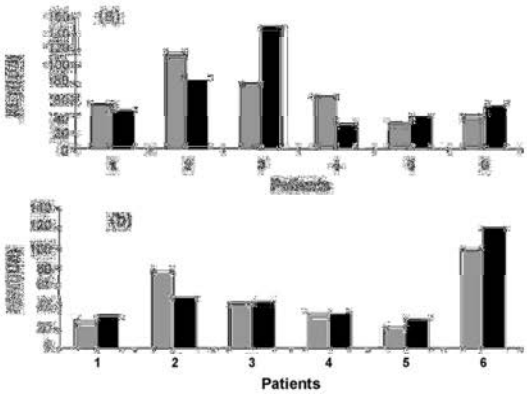


Figure 1 ALT (a) and AST (b) levels for individual patients at the initial and the follow-up biopsy.

Table 1 Changes in metabolic features during follow-up.

Patient characteristics	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4		Patient 5		Patient 6	
	Index biopsy	Follow-up biopsy	Index biopsy	Follow-up biopsy	Index biopsy	Follow-up biopsy	Index biopsy	Follow-up biopsy	Index biopsy	Follow-up biopsy	Index biopsy	Follow-up biopsy
Age (years)	51	61	38	43	34	39	54	56	46	48	31	36
BMI (kg/m^2)	27.28	27.68	26.09	25.1	22.53	22.83	31.64	32.83	25.23	25.23	28.9	32.37
Serum glucose (mmol/l)	5.2	5	5.6	5.66	5.1	5.9	5.5	5.5	5.27	4.7	5.3	4.27
Fasting insulin (μUI/ml)	13.7	12.8	8	10.8	6.8	9.22	26	7.83	5	5.22	30	9.18
HOMA-IR	3.16	2.84	1.99	2.71	1.54	2.41	6.35	1.91	1.17	1.09	7.06	2.96
Cholesterol (mmol/l)	10.02	6.03	3.94	5.16	6.16	5.1	4.61	4.58	4	3.99	5.57	5.36
Triglycerides (mmol/l)	5.08	1.5	0.72	2.35	1.47	1.31	1.15	0.82	0.71	0.57	1.75	1.9
Associated comorbidities (yes/no)												
HTN (> 130/80 mmHg)	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Antihyperthensive drugs (N)	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0
Diabetes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CAD/stroke	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

BMI: body mass index; HTN: arterial hypertension; CAD: coronary artery disease.

Table 2 Histological features on the initial and the follow-up liver biopsy.

Patient	Initial biopsy			Follow-up biopsy						
	Sample size (mm)	Steatosis (%)	Interval between biopsies (years)	Sample size (mm)	NAS	Steatosis (%)	Inflammation	Ballooning	Portal fibrosis[a]	Sinusoidal fibrosis[a]
1	18	80	10	27	5	70	0	2	0	0
2	20	70	4.9	28	6	70	1	2	0	0
3	19	80	4.3	25	5	70	1	1	0	1A
4	13	70	2.3	33	4	10	1	2	1B	0
5	25	20	2.3	23	3	30	0	2	0	0
6	18	30	5	10	6	70	2	1	0	1C

NAS: NAFLD activity score.
1A: mild zone 3 perisinusoidal fibrosis; 1B: moderate zone 3 perisinusoidal fibrosis; 1C: portal/periportal fibrosis.
[a] Defined according to Kleiner et al. [8].

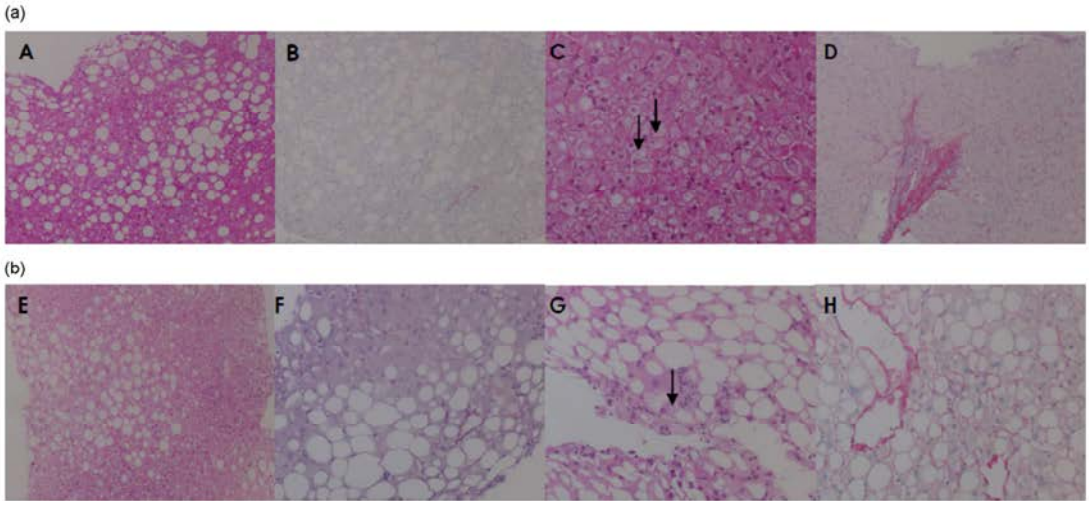


Figure 2 Histological progression from isolated steatosis to steatohepatitis.
Patient 4. *Initial biopsy, isolated steatosis*: steatosis 70% without ballooning (A) or perisinusoidal fibrosis (B). *Follow-up biopsy, steatohepatitis*: steatosis 10% with hepatocyte ballooning (C, arrow) and portal fibrosis (D). H&E stain (A, C) and red Sirius-Hematein stain (B, D); × 100 fold magnification except for C, × 200 fold. Patient 6. *Initial biopsy, isolated steatosis*: steatosis 30% without ballooning (E) or perisinusoidal fibrosis (F). *Follow-up biopsy, steatohepatitis*: steatosis 70% with a cluster of inflammatory cells surrounding a ballooning hepatocyte containing a Mallory body (G, arrow); perisinusoidal fibrosis close to a centrolobular vein (H). H&E stain (E, G) and red Sirius-Hematein stain (F, H); × 200 fold magnification, except for E, × 100 fold.

17.5 (range 2–24), respectively. At baseline, all patients had isolated steatosis without associated inflammation or liver cell injury. Four patients had significant steatosis involving more than 66% of the liver parenchyma. At follow-up, all patients had a diagnosis of steatohepatitis based on the presence of hepatocyte ballooning in all and inflammation in four patients (Table 2).

The median NAS score was 4.5 (range from 3 to 6) at the end of follow-up. Steatosis grade was unchanged in four patients and increased in one patient. Only one patient had a significant decrease of the steatosis grade at the end of the follow-up period (from 70 to 10%). Grade 1 fibrosis according to Kleiner et al.'s classification [8] was present in three patients on the follow-up biopsy (Fig. 2).

Discussion

This retrospective case series clearly documents that patients with isolated steatosis can progress to NASH. All patients had a second liver biopsy compatible with steatohepatitis, as ballooning was present in all patients and most displayed lobular inflammation in addition to ballooning. Another element indicative of real disease progression in these patients is the occurrence of fibrosis along with steatohepatitis in some of the patients described here. Remarkably, the occurrence of steatohepatitis was not related to changes in the amount of steatosis, as all but two patients had a stable amount, while one increased and another had a reduction of liver fat. In this small series, we could not identify clear predictors of disease progression. Nonetheless, these observations provide the proof of concept that transition between steatosis and steatohepatitis is possible. Previous data have shown a very good long-term prognosis of patients with steatosis alone [2–4], thus suggesting that the fate of patients with NAFLD is determined early: either stable steatosis or potentially progressive steatohepatitis. Data presented here that document the possibility of a transition between these two conditions within a short time frame are challenging previous interpretations of the natural history of NAFLD.

Sampling variability is a significant confounder of the histological diagnosis and it has been shown that ballooning and intralobular inflammation/necrosis are particularly prone to sampling error [9,10]. While it is possible that lesions of steatohepatitis were missed by the initial biopsy, all but one patient had an initial biopsy longer than 15 mm, a sample size usually deemed acceptable for a reliable pathological analysis. However, as this possibility cannot be excluded, it is important to keep in mind that even when the liver biopsy shows steatosis alone, there is a possibility that the patient has, in fact, unrecognized steatohepatitis.

A second explanation for the progression from bland steatosis to steatohepatitis is worsening of the metabolic condition, namely the degree of insulin resistance. Numerous transversal studies have shown that insulin resistance is an almost universal finding in NAFLD. Prospective studies have also demonstrated that worsening of the clinical features of insulin resistance (namely, the manifestations of the metabolic syndrome) is associated with the occurrence of ultrasonographically defined steatosis [11]. Experimental studies have shown that insulin resistance is the main driving force behind excessive hepatic fat accumulation but also one of the triggers of lipotoxicity, a mechanism believed to be involved in the genesis of hepatic inflammation and hepatic cell death [12]. Importantly, there seems to be a

higher level of insulin resistance in patients with steatohepatitis than in those with isolated steatosis [13]. Therefore, changes in weight, lifestyle or glucose or lipid metabolism during follow-up could be indicative of insulin resistance worsening and a potential for progression from steatosis to steatohepatitis. In the present case series, there does not seem to be an obvious trend towards worsening of insulin resistance during follow-up, although all patients still presented several metabolic risk factors at the time of the second liver biopsy. Therefore, a more plausible explanation is that a longer exposure of the liver to an overall state of insulin resistance might trigger the transition to steatohepatitis. Recent studies have indicated that fatty acid flux throughout the liver, which is related to an increased release of free fatty acids from insulin-resistant adipose tissue, results in the production of acyl-CoA derivatives and numerous species of inflammatory lipids or saturated fatty acids [14]. These lipid species are responsible for oxidative and endoplasmic reticulum stress and apoptosis, which result in hepatic inflammation and hepatic cell injury [15]. However, the progression from bland steatosis to steatohepatitis is not a systematic event and, in a majority of patients, does not occur within a short time frame. It is possible that vigorous reparative mechanisms, a high capacity of esterification and storage in inert triglyceride deposits or adaptive responses conferring protection against lipotoxicity might account for the lack of progression beyond the steatosis stage in some individuals.

There are only a few other reports of cases in which progression from steatosis to steatohepatitis was documented on a follow-up liver biopsy. In a series of 22 patients with repeat liver biopsy at a 5.7-year interval, Harrison et al. [6] reported on two patients with isolated steatosis on the first biopsy and steatohepatitis on the second, with inflammation and fibrosis scores of 1. Details about changes in medication, alcohol consumption, weight or other metabolic parameters were not provided in the report. Kim et al. [7] also reported on two patients with progression from steatosis to steatohepatitis with ballooning, portal inflammation, piecemeal necrosis and fibrosis (including stage 2 in one patient). One patient had morbid obesity and both had diabetes and arterial hypertension with no changes during follow-up. Importantly, none of these reports specified whether the same pathologist read both samples and whether issues of interobserver variability had been minimized by randomly reading the baseline and follow-up biopsies together.

If these observations of disease progression in patients with steatosis are further confirmed and differentiated from what might be expected by mere sampling variability, our current practices of monitoring should be updated. As isolated steatosis is considered a benign, non-progressive condition, most practitioners would currently not recommend a regular hepatological follow-up but rather focus on the treatment or prevention of the features of the metabolic syndrome. Yet, if progression in a subset of patients with bland steatosis is possible, these patients should be followed regularly for their liver disease. The optimal procedures for follow-up have not yet been determined; however, routine follow-up liver biopsies (for instance, every five years) can be proposed. Alternatively, non-invasive monitoring either of liver fibrosis or of steatohepatitis markers could be performed, with liver biopsy restricted to cases where progression of the disease is suspected from persistent changes in surrogate markers.

In conclusion, patients with isolated steatosis might progress to steatohepatitis. This could be explained either by missed lesions of steatohepatitis on the initial biopsy because of sampling variability, or to real disease progression, possibly explained by the persistence or worsening of metabolic risk factors. These observations have obvious prognostic implications and therefore, current recommendations which omit hepatic monitoring in patients with isolated steatosis are not adequate. The occurrence or worsening of metabolic risk factors, or, when fully validated, the increase in non-invasive fibrosis or steatohepatitis markers should prompt additional investigations, such as a repeat liver biopsy.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

[1] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology 2006;43(2 Suppl. 1): S99—112.
[2] Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2009;51(2):371—9.
[3] Soderberg C, Stal P, Askling J, Glaumann H, Lindberg G, Marmur J, et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. Hepatology 2010;51:595—602.
[4] Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. Gastroenterology 2005;129(1):113—21.
[5] Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. Hepatology 2006;44(4): 865—73.
[6] Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. Am J Gastroenterol 2003;98(9):2042—7.
[7] Kim SR, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K. Two cases of non-alcoholic steato-hepatitis developing from simple fatty liver. J Gastrointestin Liver Dis 2009;18(4):491—5.
[8] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2005;41(6):1313—21.
[9] Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2005;128(7):1898—906.
[10] Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, Weston SR, Pabst MS, Aouizerat BE, et al. Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2006;44(4):874—80.
[11] Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. Ann Intern Med 2005;143(10):722—8.
[12] Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 2008;28(4):360—9.
[13] Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver,steatohepatitis,

and the metabolic syndrome. Hepatology 2003;37(4): 917—23.
[14] Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2007;46(4):1081—90.
[15] Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. J Biol Chem 2009;284(9):5637—44.