



Marqueurs non-invasifs de stéatose et fibrose hépatique

Hugo Perazzo Pedroso Barbosa

► To cite this version:

Hugo Perazzo Pedroso Barbosa. Marqueurs non-invasifs de stéatose et fibrose hépatique. Sciences agricoles. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066046 . tel-00989999

HAL Id: tel-00989999

<https://theses.hal.science/tel-00989999>

Submitted on 12 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Spécialité

Physiologie et Physiopathologie (ED 394)

Présenté par

M. Hugo Perazzo

Pour obtenir le grade de

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

Sujet de la thèse:

Marqueurs non-invasifs de stéatose et fibrose hépatique

Soutenue le **14 mars 2014** devant le jury composé de:

Professeur Fabrice Carrat, PU-PH, Université Paris 6, Président du jury

Professeur Dominique Bellet, PU, Université Paris 5, Rapporteur

Professeur Dominique Roulot, PU-PH, Université Paris 13, Rapporteur

Docteur Johanne Silvain, MCU-PH, Université Paris 6, Examineur

Docteur Laurent Castera, PH, Université Paris 7, Examineur

Directeur de Thèse: Professeur Thierry Poynard, PU-PH, Université Paris 6

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

Table des Matières

	Page
Dedicace.....	v
Remerciements.....	vi
Liste des Abréviations.....	x
Résumé.....	xii
Summary.....	xiv
Liste de publications en rapport avec la thèse.....	xvi
Objectifs de la thèse.....	xvii
Chapitre I - Stéatopathie non-alcoolique.....	1
<i>I-1. Définitions.....</i>	<i>1</i>
<i>I-2. Epidémiologie.....</i>	<i>1</i>
<i>I-3. Pathogénèse.....</i>	<i>2</i>
<i>I-4. Diagnostic.....</i>	<i>4</i>
<i>I-4-1. Ponction biopsie hépatique.....</i>	<i>4</i>
<i>I-4-2. Méthodes d'imagerie "classiques".....</i>	<i>6</i>
<i>I-4-3. Marqueurs non-invasifs.....</i>	<i>7</i>
Chapitre II - Le FibroScan (EchoSens, Paris, France).....	10
<i>II-1. Caractéristiques techniques.....</i>	<i>10</i>
<i>II-2. Limitations de l'élastographie transitoire.....</i>	<i>12</i>
<i>II-2-1. Aplicabilité.....</i>	<i>12</i>
<i>II-2-2. L'effet operateur.....</i>	<i>13</i>
<i>II-2-3. Reproductibilité.....</i>	<i>14</i>
<i>II-2-4. Facteurs associés aux "faux positifs".....</i>	<i>14</i>
<i>II-3. Performance diagnostique de l'élastographie transitoire.....</i>	<i>15</i>

II-3-1. Méthodologie dans l'évaluation de la performance diagnostique.....	15
II-3-2. Au cours des maladies chroniques du foie hors stéatopathie non-alcoolique.....	17
II-3-3. Au cours de la stéatose stéatopathie non-alcoolique.....	20
II-4. Valeur pronostique de l'élastographie transitoire.....	21
II-5. La mesure du CAP ("Controlled Attenuated Parameter").....	25
Chapitre III - Le FibroMax (BioPredictive, Paris, France).....	29
III-1. Rationnel scientifique.....	30
III-2. Procédures pré-analytiques et analytiques.....	31
III-2-1. Procédure pré-analytique.....	31
III-2-2. Procédure analytique.....	32
III-3. Interprétation et Applicabilité.....	33
III-4. Facteurs associés aux faux positifs ou faux négatifs.....	34
III-5. Performance diagnostique.....	36
III-5-1. FibroTest.....	36
III-5-2. ActiTest.....	40
III-5-3. SteatoTest, NashTest et AshTest.....	42
III-6. Valeur pronostique du FibroTest au cours des maladies chroniques du foie.....	44
Chapitre IV - Limites des marqueurs non-invasifs.....	47
IV-1. Applicabilité.....	47
IV-2. Variabilité	49
IV-3. Facteurs influençant l'estimation de la fibrose.....	50
IV-4. Objectifs du travail.....	52
IV-5. Article 1: " Interobserver Variability in Transient Elastography Analysis of Patients with Chronic Hepatitis C "	54
IV-5-1. Tableaux supplémentaires de l'article 1.....	76
IV-5-2. Discussion de l'article 1.....	80

IV-6. Article 2: "Aspartate-to-platelet ratio index (APRI) variability as a biomarker of fibrosis in patients with chronic hepatitis C"	84
IV-6-1. Tableaux supplémentaires de l'article 2.....	108
IV-6-2. Discussion de l'article 2.....	114
IV-7. Article 3: "Hepatic steatosis per non-invasive biomarkers leads to an overestimation of fibrosis based on liver stiffness measurement in type 2 diabetic patients"	116
IV-7-1. Tableaux supplémentaires de l'article 3.....	141
IV-7-2. Discussion de l'article 3.....	145
Chapitre V - Valeur pronostique du FibroMax chez les sujets à risque d'une stéatopathie non-alcoolique.....	148
V-1. Association entre stéatopathie non-alcoolique, diabète et dyslipidémie.....	148
V-2. Stéatopathie non-alcoolique et maladie cardiovasculaire.....	149
IV-2-1. Stéatopathie non-alcoolique et marqueurs d'athérosclérose.....	150
IV-2-2. Stéatopathie non-alcoolique et complications cardiovasculaires.....	151
V-2-3. Mécanismes de liaison entre la stéatopathie non-alcoolique et la maladie cardiovasculaire.....	153
V-3. Stéatopathie non-alcoolique et mortalité.....	155
V-4. Objectifs du travail.....	159
V-5. Article 4: "Prognostic value of liver fibrosis and steatosis biomarkers in type 2 diabetes and dyslipidemia"	161
V-5-1. Tableaux supplémentaires de l'article 4.....	193
V-6. Discussion.....	205
Chapitre VI - Conclusions et perspectives.....	213
Chapitre VII - Références bibliographiques.....	215
Chapitre VIII - Article annexe: " The Interactions of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Diseases"	245

*Je dédie cette thèse à deux femmes, les deux
Maries de ma vie, sans lesquelles ce travail
ne serait pas possible d'être réalisé:*

Maria Emilia, mon épouse et ***Maria Gabriela***, notre fille,

Je vous aime.

Remerciements

La section de remerciements de ce mémoire de thèse que clôturent 4 ans de travail a été la partie la plus agréable, mais aussi la plus difficile à écrire car prend en compte les sentiments et les émotions. L'originalité doit être un facteur essentiel dans la recherche, donc je voudrais remercier à tous ceux qui ont participé à mon parcours d'une façon différente en laissant pour chacun(e) une citation d'un scientifique ou d'un philosophe célèbre.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Professeur Thierry Poynard, pour m'avoir donné une opportunité unique dans ma vie. M. Poynard m'a guidé, encouragé, conseillé, fait beaucoup apprendre à travailler dans la recherche clinique pendant ces 4 ans tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur. Il m'a fait apprécier la statistique en prenant en compte son sens global dans la problématique en question. Pour un génie, une citation d'un génie: *"La valeur d'un homme tient dans sa capacité à donner et non dans sa capacité à recevoir"* - **Albert Einstein**

Mes plus grands remerciements vont également à ma co-directrice de thèse, le Professeur Chantal Housset, pour la gentillesse et la patience qu'elle a manifestées à mon égard durant cette thèse, pour tous les conseils, surtout pendant l'écriture de cette mémoire et des articles scientifiques, et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer à sa prestigieuse équipe. *"La simplicité est la sophistication suprême"* - **Leonardo Da Vinci**

J'adresse également mes plus vifs remerciements à ma collègue et amie Mona Munteanu pour l'accueil chaleureux, la disponibilité, l'aide scientifique, ainsi que pour l'intérêt qu'elle a manifestée à l'égard de mes recherches. *"La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés"* - **Louis Pasteur**

Je remercie profondément les Professeurs Fabrice Carrat, Dominique Bellet et Dominique Roulot, ainsi que aux Docteurs Johanne Silvain et Laurent Castera, qui m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance. *"La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance"* - **Claude Bernard**

Je remercie tous mes collègues du Service d'Hépatogastroentérologie du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière pour l'accueil chaleureux qui m'a fait sentir à la maison depuis mon arrivé. J'adresse un remerciement spécial au Dr. Touraj Mansourbakht pour m'avoir

permis de partager le bureau avec lui et pour les discussions sur le foot que m'ont décontraté dans des moments difficiles. *"Détruire la concurrence, c'est tuer l'intelligence"* - **Frédéric Bastiat**

Je remercie spécialement à mes amies, Larysa Fedchuck, Elena Luckina pour le travail de "BAFiste" avec moi et l'accueil qui m'a beaucoup aidé dans mon adaptation dans un pays étranger. Je remercie à Raluca Pais pour sa gentillesse et à Yen Ngo pour l'accueil, l'aide dans la récupération des données et pour les leçons de statistique. Je remercie Noemi Seurat pour l'aide dans la convocation des patients. Je remercie également à Fabio Nascimbeni pour la gentillesse et les discussions scientifiques, une personne qui est arrivé à la fin de mon parcours mais est devenue un ami. Merci à vous tous pour les bons moments dans la salle de garde de la Pitié pendant la "religieuse" pause du midi en mangeant de la salade de concombre et du yaourte avec le manche d'une fourchette suivi par du café froid, qui revigorait le esprit pour le travail de l'après-midi. *"On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison."* - **Henri Poincaré**

Je tiens plus largement à exprimer ma reconnaissance à toutes celles et à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement au bon déroulement de mes travaux. Je remercie Brigitte Hauteceur, la secrétaire du patron, pour l'accueil, la gentillesse, l'aide et la force pour résoudre tout type de problème. Je remercie les Tecs de recherche, Muriel, Stephany et Carole pour la gentillesse. Je remercie également les toutes secrétaires, les personnes de l'accueil à la consultation, les infirmières de l'Hôpital du Jour ainsi que celles de la consultation au RH, Isabelle, Sophie et Valérie pour l'aide avec les patients inclus dans ma thèse. *"Plus nous sentons le besoin d'agir, plus nous devons nous efforcer à la réflexion. Plus nous sommes tentés par le confort de la méditation, plus nous devons nous lancer dans l'action."* - **Albert Jacquard**

J'adresse mes remerciements à mes collègues du Service de Biochimie, Nittia, Marion et Fanny, pour le travail avec les échantillons sanguins des patients ainsi qu'à ceux qui travaillent dans le Service de Diabétologie et de Dyslipidémie du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière pour m'avoir donné l'honneur de travailler avec ses patients. *"Lorsque deux forces sont jointes, leur efficacité est double."* - **Isaac Newton**

J'exprime toute ma gratitude à Célia, Philippe, Rodrigo, Cécilia, Gabriel, Durval, Marilia, Adriana, Pietro et Taciana, qui font partie de l'extension de la famille Perazzo à Paris,

pour nous faire sentir en famille pendant les repas de dimanche. Je voudrais remercier en spéciale, mon cousin Rodrigo qui est devenu mon frère et ma tante Célia qui m'a considéré comme l'un de ses fils, pour l'accueil chaleureux et l'aide pendant mon séjour en France. *"Il y a des mots incapables d'être définis"* - **Blaise Pascal**

Mes remerciements vont encore à la pédiatre, le Docteur Anne Cortey et sa famille pour son amitié que nous a permis de trouver une vraie amie pour le reste de notre vie. Anne, merci d'avoir croisé notre chemin. Je remercie également Santiago, Mari et toute la famille Villenueza qui nous ont acceptés comme locataires dans l'appartement de nos rêves à Paris, pour la gentillesse et l'accueil que nous a permis de retrouver d'amies. Il nous semblait que nous nous connaissions depuis long temps à cause de l'aimabilité dégagé vers nous pendant ces dernières années. Merci Anne, Mari et Santiago pour les petits gestes qui ont été grands choses pour nous. *"Les grands choses peuvent se manifester par de petits signes"* - **Sigmund Freud**

Je tiens à remercier profondément toute ma famille et mes amis qui sont restés au Brésil pour les encouragements, le soutien et la confiance qu'ils m'ont toujours accordés tout au long de ces années. Bien sûr, un immense merci du fond du coeur à mes parents qui m'ont donné la liberté de faire ce que j'aime dans les meilleures conditions et qui m'ont appris que le mieux chemin dans la vie est fait par les études. *"Il faut faire de la vie un rêve et faire d'un rêve la réalité"* - **Pierre Curie**

J'adresse également de chaleureux remerciements au plus grand médecin et scientifique brésilien, Dr.Oswaldo Cruz (1872-1917), pour m'avoir donné des "petits conseils" inspirés par son brillant parcours dans la recherche Franco-Brésilienne et par sa capacité de changer une nation par la recherche médicale. J'espere que je puisse avoir l'honneur de lui rencontrer dans l'unité de recherche clinique celestiale dans l'étape suivante à la vie. *"Pour les erreurs des autres, l'homme sage corrige les siens."* - **Oswaldo Cruz**

Je tiens à remercier du fond du coeur les deux femmes de ma vie à qui je dedie ce travail. Je remercie ma fille, Maria Gabriela, pour être un exemple pour moi à l'âge de 5 ans et pour être la meilleure fille qui un père pourrait avoir. Je remercie ma chérie, Maria Emilia, pour avoir tout quitté afin de se jeter a found dans cette aventure, pour faire confiance à moi et m'aimer, pour comprendre que, quelques fois, avoir une valeur $p < 0.05$ est plus important que une balade au Jardin de Luxembourg dans un samedi matin ensoleillé et enfin, pour aimer la

plus belle ville du monde, Paris. Pour nous trois, je laisse une dernière citation que résume nos changements de vie dans les dernières années:

"Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements" - **Charles Darwin**

Liste des Abréviations

A2M: Alpha-2-macroglobuline

ALAT: alanine aminotransférase

ASAT: aspartate aminotransférase

Apo-A1: Apolipoprotéine-A1

APRI: Aspartate-to-platelet ratio index

AUROC: area under the receiver operating characteristic curve

CAC: Calcium des artères coronaires

CAP: Controlled Attenuated Parameter

CV: Cardiovasculaire

dB/m: décibels par mètre

EIMc: épaisseur intima-média carotidienne

FLI: Fatty Liver Index

GGT: gammaglutamyl transférase

GPVH: Gradient de pression veineuse hépatique

HbA1c: hémoglobine glyquée

HR: Hazard ratio

HSI: Hepatic Steatosis Index

IC: Intervalle de confiance

IDM: Infarctus du myocarde

IMC: indice de masse corporelle

IQR: Inter-quartil range

IRM: Imagerie par résonance magnétique

k: Kappa

kPa: Kilopascals

LSN: Limite supérieure de la normale

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease

NAS: NAFLD activity scor

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

NF- κ B: Facteur nucléaire kappa beta

PBH: Ponction biopsie hépatique

SAF: Steatosis Activity Fibrosis

SCORE: Systematic coronary risk evaluation

TdR: Taux de réussite

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

VHB: Virus de l'hépatite B

VHC: Virus de l'hépatite C

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VO: Varices oesophagiennes

wAUROC: weighted AUROC

Résumé

Le développement de méthodes non invasives d'évaluation des lésions tissulaires hépatiques a révolutionné la prise en charge des patients ayant une maladie chronique du foie, au cours des dix dernières années. Les méthodes les plus utilisées et les mieux validées sont l'élastométrie et parmi les biomarqueurs sanguins, le FibroTest. Progressivement, ces méthodes remplacent la ponction biopsie du foie, longtemps considérée comme l'examen de référence, mais dont l'usage est limité par les effets indésirables, les erreurs d'échantillonnage et la variabilité d'interprétation inter-observateur. La stéatopathie non-alcoolique (NAFLD) caractérisée par l'accumulation anormale de graisse dans les hépatocytes chez des sujets ayant des désordres métaboliques, est devenue la forme la plus fréquente de maladie hépatique. Le spectre clinique de la NAFLD va de la stéatose simple à la steatohépatite non-alcoolique (NASH), et inclue différents stades de fibrose jusqu'à la cirrhose. Différentes études suggèrent que la NAFLD est associée à un risque accru de mortalité, en particulier d'origine cardiovasculaire.

Les objectifs de cette thèse étaient 1) de mieux définir certaines limites des méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose hépatique comme la reproductibilité ou les facteurs responsables d'une surestimation de la fibrose; 2) d'évaluer la valeur pronostique du FibroTest et d'un biomarqueur de stéatose, le SteatoTest chez les patients ayant un diabète et/ou une dyslipidémie.

Le travail réalisé a permis de montrer une variabilité interobservateur notable de l'élastométrie entre deux opérateurs expérimentés, dans une population de patients ayant une hépatite chronique virale C. La stéatose du foie, estimée par le SteatoTest et trois autres marqueurs non invasifs, a été identifiée comme un facteur indépendant associé à la surestimation de la fibrose du foie par l'élastométrie chez les sujets ayant un diabète de type 2. Nous avons également mis en évidence une variabilité du test de fibrose hépatique l'a-

Aspartate-to-Platelets Ratio Index (APRI) et l'impact de l'activité nécrotico-inflammatoire sur ce test dont la formule comprend l'aspartate transaminase exprimée en multiple de la normale, chez des patients ayant une hépatite chronique virale C.

Chez des patients ayant une maladie métabolique (diabète de type 2 et/ou d'une dyslipidémie) étant donc à haut risque de NAFLD, nous avons pu démontrer la valeur pronostique à 10 ans du FibroTest et du SteatoTest, pour prédire la mortalité globale indépendamment des facteurs métaboliques. Le FibroTest était également prédictif de la mortalité d'origine hépatique et de l'incidence des complications cardiovasculaires et le SteatoTest de la mortalité d'origine cardiovasculaire. Les relations entre NAFLD et maladie cardiovasculaire ainsi que la valeur pronostique de biomarqueurs hépatiques ouvrent la perspective de nouveaux scores "cardio-hépatiques" pour améliorer la prévention des évènements graves d'ordre cardio-métabolique ou hépatique.

Summary

The development of non-invasive methods for the evaluation of liver injury has been a revolution for patient's care in Hepatology in the past 10 years. Historically, liver biopsy has been used to stage liver fibrosis. However, this method has been challenged by limited feasibility, potential complications, sampling error and interobserver variability. Several non-invasive methods have been proposed to replace liver biopsy. Transient elastography based on liver stiffness measurement and FibroTest are the most widely used and best validated non-invasive methods to assess liver fibrosis.

Subjects with metabolic disorders such as type-2 diabetes or dyslipidemia, have a high risk of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most prevalent chronic liver disease worldwide. NAFLD begins with simple steatosis, *i.e.* fat accumulation in hepatocytes, and can progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis and/or cirrhosis, which are associated with life-threatening complications. Evidence was previously provided to indicate that NAFLD is associated with an increased risk of cardiovascular disease and overall mortality.

The aims of this thesis were: 1) to evaluate the main limitations of non-invasive methods to assess liver fibrosis, such as reproducibility or the impact of factors, which may lead to an overestimation of hepatic fibrosis by these methods; 2) to evaluate the prognostic value of liver biomarkers, such as FibroTest and SteatoTest, in patients with type-2 diabetes and/or dyslipidemia.

In a first study, we demonstrated a marked interobserver variability of transient elastography between two experienced operators in chronic hepatitis C. Hepatic steatosis, estimated by SteatoTest and three other non-invasive markers, was identified as an

independent factor associated with an overestimation of liver fibrosis by transient elastography in patients with type-2 diabetes.

We could also show the variability of the Aspartate-to-Platelets Ratio Index (APRI) test, based on the expression of aspartate aminotransferase relative to the upper limit of normal for aspartate aminotransferase and the risk of overestimating fibrosis stage by this test due to necro-inflammatory activity in chronic hepatitis C.

Finally, we reported that FibroTest and SteatoTest had a 10-year prognostic value for prediction of overall mortality independently of metabolic factors in patients at high risk of NAFLD. FibroTest was also predictive of liver-related death and incidence of cardiovascular events. In addition, SteatoTest had a prognostic value for cardiovascular-related death. The prognostic value of liver biomarkers associated with the relationship between NAFLD and cardiovascular disease may pave the way for the development of a "cardio-liver" prognostic index in patients with metabolic disorders.

Liste de publications en rapport avec la thèse

- **Article # 1:** Accépté avec "minor revision" - **Liver International - IF:3.9**

Interobserver Variability in Transient Elastography Analysis of Patients with Chronic Hepatitis C

Hugo Perazzo, Flavia F Fernandes , Amanda Gomes, Carlos Terra, Renata M Perez, Fátima A F Figueiredo

- **Article # 2:** Soumis

Aspartate-to-platelet ratio index (APRI) variability as a biomarker of fibrosis in patients with chronic hepatitis C

Hugo Perazzo, Raluca Pais, Mona Munteanu, Yen Ngo, Denis Monneret, Françoise Imbert-Bismut, Joseph Moussalli, Pascal Lebray, Yves Benhamou, Dominique Thabut, Vlad Ratziu, Victor de Ledhingen, Thierry Poynard for the FibroFrance Group and EPIC3 Group.

- **Article # 3:** Soumis

Hepatic steatosis per non-invasive biomarkers leads to an overestimation of fibrosis based on liver stiffness measurement in type 2 diabetic patients

Hugo Perazzo, Mona Munteanu, Yen Ngo, Pascal Lebray, Elena Lukina, Noemi Seurat, Fanny Rutka, Marion Couteau, Sophie Jacqueminet, Denis Monneret, Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratziu, Agnes Hartemann-Huertier, Chantal Housset and Thierry Poynard for the FLIP Consortium

- **Article # 4:** En révision favorable - **Journal of Hepatology - IF: 9.5**

Prognostic value of liver fibrosis and steatosis biomarkers in type 2 diabetes and dyslipidemia

Hugo Perazzo, Mona Munteanu, Yen Ngo, Pascal Lebray, Noemi Seurat, Fanny Rutka, Marion Couteau, Sophie Jacqueminet, Philippe Giral, Denis Monneret, Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratziu, Agnès Hartemann-Huertier, Chantal Housset, Thierry Poynard for the FLIP Consortium

- **Article annexe:** Révise publié en Février 2014 - **Clinics in Liver Disease - IF: 2.8**

Perazzo, H., T. Poynard, et al. (2014). "The interactions of nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases." Clin Liver Dis **18**(1): 233-248.

Objectifs de la thèse

D'un point de vue historique, la ponction biopsie du foie est la première méthode qui ait été utilisée pour évaluer les lésions tissulaires hépatiques, en particulier le stade de fibrose chez les sujets souffrant de maladie chronique du foie. Son usage est cependant limité par les effets indésirables, les erreurs d'échantillonnage et la variabilité d'interprétation inter-observateur. Au cours des dix dernières années, la prise en charge des patients ayant une maladie chronique du foie a été révolutionnée par les méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose. Les principales méthodes actuellement disponibles font appel à l'imagerie, comme l'élastométrie et aux biomarqueurs sanguins, parmi lesquels le FibroTest est le mieux validé et le plus utilisé à travers le monde.

La stéatopathie non-alcoolique (NAFLD) est la traduction hépatique des désordres d'ordre métabolique, caractérisée par l'accumulation de graisse dans les hépatocytes. C'est devenu la forme la plus fréquente de maladie hépatique et un enjeu majeur de santé publique.

L'objectif général de cette thèse était de définir la place des marqueurs non invasifs dans les maladies chroniques du foie, en particulier la NAFLD. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé, dans un premier temps, des études sur la variabilité de l'élastométrie et d'un biomarqueur sanguin, l'aspartate-to-platelets ratio index (APRI), dans l'hépatite chronique virale C, maladie chronique du foie la mieux connue. Nous avons ensuite évalué l'impact de la stéatose sur l'estimation de la fibrose hépatique par l'élastométrie chez les patients diabétiques de type 2. L'objectif final a été d'évaluer la valeur pronostique du FibroTest et d'un biomarqueur de stéatose, le SteatoTest, chez les patients à haut risque d'une NAFLD, ayant un diabète de type 2 et/ou une dyslipidémie.

Chapitre I - Stéatopathie non-alcoolique

I-1. Définitions

La stéatopathie non-alcoolique, en anglais *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est une affection caractérisée par l'accumulation anormale de graisse dans les hépatocytes (Angulo 2002). L'accumulation de graisse dans plus de 5% des hépatocytes définit une stéatose du foie significative. Lorsque celle-ci atteint plus de 66 % des hépatocytes la stéatose est considérée comme sévère (Kleiner, Brunt et al. 2005; Bedossa, Poitou et al. 2012). Cette maladie est intimement associée aux facteurs métaboliques, comme l'obésité viscérale, l'insulinorésistance, ainsi que la dyslipidémie et le diabète de type 2 (Marchesini, Brizi et al. 2001).

La NAFLD occupe un large spectre allant de la stéatose simple à la stéatohépatite non-alcoolique, en anglais *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH), et différents stades de fibrose jusqu'à la cirrhose (Angulo 2002). La stéatose simple est définie par la présence d'une stéatose sans lésion cellulaire comme la ballonnisation des hépatocytes. La NASH est définie par la présence d'une stéatose associée à des foyers nécrotico-inflammatoires à cellules mononucléées ou à polynucléaires, une ballonnisation des hépatocytes avec ou sans corps de Mallory et une fibrose perisinusoïdale (Harrison and Neuschwander-Tetri 2004). Le plus souvent, la stéatose simple a un bon pronostic à long terme. Pourtant, 5-25% des patients peuvent progresser de la stéatose simple à la NASH associée à la fibrose hépatique (Day 2005). Environ 30% des patients ayant une NASH développent une fibrose significative et jusqu'à 15-20% peuvent évoluer vers la cirrhose et ses complications (Bugianesi, Leone et al. 2002).

I-2. Épidémiologie

Actuellement, la NAFLD est la maladie hépatique chronique la plus fréquente au monde (Browning, Szczepaniak et al. 2004). La prévalence reportée dans les études dépend de la population étudiée et surtout de la méthode diagnostique. La prévalence est entre 6 et 30% dans la population générale en fonction de la méthode diagnostique utilisée (Vernon, Baranova et al. 2011). La stéatose métabolique représente 39 % des nouveaux cas de maladie chronique du foie aux États-Unis (Weston, Leyden et al. 2005). En France, 55 % des cas d'augmentation des transaminases sont expliqués par la présence d'une stéatose hépatique (de Ledinghen, Ratzu et al. 2006). Cette prévalence croissante de la NAFLD dans la population générale fait de cette maladie un véritable problème de santé publique.

L'augmentation de prévalence de la NAFLD au cours des dernières années a suivi l'augmentation de fréquence du syndrome métabolique et de ses facteurs de risque, comme l'obésité, la dyslipidémie ou le diabète du type 2. Environ 90% des patients obèses morbides ayant subi une chirurgie bariatrique ont une NAFLD (Boza, Riquelme et al. 2005). Il existe une stéatose hépatique chez 69% à 87% des patients diabétiques du type 2, ce qui souligne la forte association entre ces deux pathologies (Leite, Salles et al. 2009). La stéatose hépatique affecte aussi jusqu'à 50% des patients ayant une dyslipidémie (Assy, Kaita et al. 2000). Il n'a pas encore été clairement déterminé malgré des nombreuses études si c'était la stéatose qui provoque la dysfonction métabolique ou si celle-ci était responsable de l'accumulation de graisse dans les hépatocytes et donc de la NAFLD (Taylor 2008; Fabbrini, Sullivan et al. 2010).

I-3. Pathogénèse

L'hypothèse du "*multi-hit*" (anciennement appelée "*double-hit*") est actuellement acceptée pour décrire la pathogénèse de la stéatose métabolique. L'insulinorésistance entraîne une augmentation des acides gras libres qui sont ensuite incorporés dans les hépatocytes

conduisant à une stéatose hépatique qui représente le "*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 (plusieurs "*second hits*") entraîne une progression vers la NASH et par conséquent ses complications (Day and James 1998; Jou, Choi et al. 2008).

La raison pour laquelle certains patients passent du "*first*" aux "*multiple hits*" et progressent ainsi de la stéatose simple à la NASH n'est pas bien connue. Cependant, plusieurs médiateurs inflammatoires participants au processus ont été décrits. Les patients ayant une NASH ont en plus grande quantité des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le facteur nucléaire kappa beta (*NF- κ B*) (Videla, Tapia et al. 2009). 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. 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 corrélée 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). Les patients obèses ayant une insulino-résistance ont des concentrations de *TNF- α* plus élevées que les non-obèses (Hotamisligil, Arner et al. 1995). Les concentrations de *TNF- α* sont corrélées à la sévérité de l'inflammation et de la fibrose hépatique (Crespo, Cayon et al. 2001; Abiru, Migita et al. 2006). D'autres facteurs comme le microbiote intestinal jouent un rôle important dans le développement d'une NASH. Malgré des habitudes alimentaires similaires, les patients obèses et ceux qui ont une NASH ont des enterotypes qui leur sont spécifiques et différent de celui des volontaires-sains (Zhu, Baker et al. 2013).

I-4. Diagnostic

Les patients ayant une NAFLD ont une discrète élévation des enzymes hépatiques et le diagnostic est basé sur l'identification d'une accumulation excessive de graisse dans le foie (>5% des hépatocytes) et l'exclusion d'autres causes de maladie hépatique.

La plupart des patients sont asymptomatiques ou ont des symptômes non spécifiques. Cependant, en cas de progression vers le stade de cirrhose des manifestations typiques de la cirrhose comme les angiomes stellaires, une circulation collatérale, un ictère ou une ascite peuvent se voir. En cas de stéatose hépatique, les diagnostics d'hépatite virale, d'hépatite auto-immune, de maladie de Wilson, d'hémochromatose et de maladie alcoolique du foie doivent être envisagés. L'hépatite chronique C du génotype 3 est souvent associée à une stéatose hépatique (Goossens and Negro 2013). Des auto-anticorps peuvent être décrites chez 20% des patients ayant une NAFLD et le plus souvent sans signification particulière (Vuppalanchi, Gould et al. 2011). Des mutations du gène HFE doivent être recherchés chez les patients ayant une stéatose hépatique associée à une élévation de la ferritinémie et de la saturation de transferrine (Bacon, Adams et al. 2011). La consommation excessive d'alcool a été définie de façon différente en fonction des études (Liangpunsakul and Chalasani 2012). Selon une définition récente le seuil retenu est de 21 unités alcooliques (~30g/jour) par semaine pour les hommes et 14 unités (~20g/jour) par semaine pour les femmes au cours des 2 dernières années (Sanyal, Brunt et al. 2011). En général, la consommation d'alcool est auto-déclarée. En cas de doute, l'information doit être confirmée auprès des proches. Le diagnostic de la NAFLD, doit s'appuyer sur une ponction biopsie hépatique, des méthodes d'imagerie ou des biomarqueurs.

I-4-1. Ponction biopsie hépatique

La ponction biopsie hépatique (PBH) dans la NAFLD permet de mettre en évidence une stéatose à prédominance macrovacolaire, des foyers nécrotico-inflammatoires à cellules mononuclées ou à polynucléaires, une ballonnisation des hépatocytes avec ou sans corps de Mallory et une fibrose perisinusoïdale (Lewis and Mohanty 2010).

Initialement, le score *NAFLD Activity Score* (NAS), développé par le *NASH Clinical Research Network* a été utilisé pour distinguer la stéatose simple de la NASH (Kleiner, Brunt et al. 2005). Le score NAS comprend plusieurs lésions hépatocytaires. La stéatose (0-3); l'inflammation lobulaire (0-2); la ballonnisation (0-2) et la fibrose (0-4) sont évalués de façon semi quantitative. De plus d'autres caractéristiques histologiques sont enregistrées de façon dichotomique (présence ou absence). Un score $NAS \geq 5$ définit la NASH, la fibrose étant évaluée à part, depuis l'absence de fibrose (score 0) jusqu'au stade de cirrhose (score 4).

Plus récemment, le score SAF (*Steatosis Activity Fibrosis*) a été proposé pour une évaluation plus simple et plus reproductible de la NAFLD. Le score SAF évalue les lésions élémentaires hépatiques, la stéatose, l'activité inflammatoire (ballonnisation 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 caractérise la NAFLD ($S \geq 1$). Les patients ayant une NAFLD sans ballonnisation ou avec une ballonnisation 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 par une ballonnisation ou une inflammation lobulaire, définit la NASH.

La gravité des maladies du foie a été d'abord évaluée par PBH. Cette méthode est généralement considérée comme la référence pour l'évaluation des patients ayant une suspicion de NAFLD. Cette méthode permet le diagnostic de la maladie et la distinction entre stéatose simple et NASH (Kleiner, Brunt et al. 2005; Bedossa, Poitou et al. 2012). De plus,

l'identification éventuelle d'une fibrose sévère ou d'une cirrhose a par conséquent le dépistage systématique des varices œsophagiennes et du carcinome hépatocellulaire (Campbell and Reddy 2004). Cependant, la PBH a une faisabilité limitée, des effets indésirables (McGill, Rakela et al. 1990). Elle est l'objet d'erreurs d'échantillonnage et d'une variabilité inter-observateur (Bedossa, Dargere et al. 2003; Colloredo, Guido et al. 2003). A cause de ces limitations, plusieurs marqueurs non-invasifs ont été proposés pour remplacer la biopsie hépatique.

I-4-2. Méthodes d'imagerie "classiques"

Les méthodes d'imagerie, l'échographie, le scanner ou tomodensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été utilisés pour le diagnostic d'une NAFLD. En échographie, le contraste de l'image hépato-rénale est utilisé pour définir la présence d'une stéatose hépatique. En l'absence de stéatose, le parenchyme hépatique a une échostructure similaire à celle du parenchyme rénal, mais celle-ci devient " brillante " secondairement à l'infiltration de graisse (Osawa and Mori 1996). Pour l'identification d'une stéatose, différentes études ont conclu à une performance diagnostique acceptable de cette méthode (Mottin, Moretto et al. 2004; Palmentieri, de Sio et al. 2006; Wu, You et al. 2012). Cependant, l'échographie est peu précise pour le diagnostic d'une stéatose lorsque le contenu en graisse du foie est inférieur à 30% des hépatocytes. En outre, l'échographie ne permet pas de faire la distinction entre la stéatose simple et la NASH (Saadeh, Younossi et al. 2002). Le scanner a également été utilisé pour évaluer la stéatose du foie, avec une performance diagnostique similaire à celle de l'échographie (Park, Kim et al. 2006; Lee, Park et al. 2007). L'IRM, semble être une méthode performante pour le diagnostic de stéatose hépatique. Cette méthode évalue la présence de graisse dans le foie par l'évaluation des déplacements différentiels entre la graisse et l'eau (Cassidy, Yokoo et al. 2009). L'IRM permet de détecter des niveaux

inférieurs de stéatose par rapport à l'échographie et au scanner (Fishbein, Castro et al. 2005). 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) Bien que l'IRM conventionnelle ou couplée à la spectroscopie par protons puisse soit plus précise que l'échographie ou le scanner pour détecter la stéatose, ces méthodes ne sont disponibles que dans des centres spécialisés. En outre, ces méthodes d'imagerie ne sont pas performantes pour distinguer avec précision la stéatose simple de la NASH.

I-4-3. Marqueurs non-invasifs

Plusieurs panels de marqueurs non-invasifs ont été décrits pour la quantification de la stéatose et le diagnostic d'une NAFLD. En revanche, ces marqueurs ont été confrontés à des méthodes différentes de référence pour la définition du critère de jugement.

Le SteatoTest, un biomarqueur qui fait partie du FibroMax, calculé en utilisant 12 paramètres, s'est montré performant pour le diagnostic d'une NAFLD chez les patients ayant une maladie chronique du foie (Poynard, Ratziu et al. 2005) et chez les obèses morbides (Poynard, Lassailly et al. 2012). La validation du SteatoTest a été réalisée en utilisant la biopsie du foie comme référence. 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). Ce biomarqueur sera discuté en détail dans le chapitre III de cette thèse.

Le *Fatty Liver Index* (FLI) est un biomarqueur qui prend en compte l'indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, les concentrations sériques de triglycérides et de gamma glutamyl transférase (GGT) pour estimer la présence d'une stéatose hépatique. Les résultats varient de 0 à 100 et ce marqueur peut être calculé par la formule suivant:

$$FLI = \frac{(e^{0.953 \cdot \ln(\text{triglycerides, mg/dl}) + 0.139 \cdot \text{IMC} + 0.718 \cdot \ln(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \ln(\text{tour de taille}) - 15.745})}{1 + (e^{0.953 \cdot \ln(\text{triglycerides, mg/dl}) + 0.139 \cdot \text{IMC} + 0.718 \cdot \ln(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \ln(\text{tour de taille}) - 15.745})} \times 100$$

L'échographie étant utilisée comme méthode de référence, ce marqueur a été jugé performant pour le diagnostic d'une NAFLD. 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% (Bedogni, Bellentani et al. 2006). Plus récemment la valeur pronostique du FLI a été également rapportée (Calori, Lattuada et al. 2011).

Le *NAFLD Fat Liver Score* utilise les paramètres métaboliques, les concentrations sériques d'insuline et de transaminases pour estimer la stéatose hépatique par la formule suivante:

$$\text{NAFLD Fat Liver Score} = -2.89 + 1.18 * (\text{syndrome métabolique} - \text{oui}=1/ \text{no}=0) + 0.45 * (\text{diabète du type 2} - \text{oui}=1/\text{non}=0) + 0.15 * (\text{insuline à jeun, mU/L}) + 0.04 * (\text{ASAT, U/L}) - 0.94 * (\text{ASAT/ALAT})$$

Ce biomarqueur a été validé dans une étude portant sur 470 patients en utilisant comme référence l'IRM couplée à la spectroscopie par protons. La performance pour le diagnostic d'une NAFLD était caractérisée par une "area under the receiver operating characteristic curve" (AUROC) de 0.87 et 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).

L'*Hepatic Steatosis Index* (HSI) prend en compte l'IMC, les concentrations sériques de transaminases et la présence d'un diabète pour estimer la stéatose hépatique par la formule:

$$HSI = 8 \times \text{ALAT/ASAT ratio} + \text{IMC} + 2 \text{ (si diabète)} + 2 \text{ (si femme)}$$

Ce biomarqueur a une performance caractérisée par une AUROC de 0.81 (95% Intervalle de Confiance 0.80-0.836)], un score HSI < 30 permet de exclure et un score > 36 de confirmer la NAFLD avec une sensibilité de 93% (Lee, Kim et al. 2010).

Plus récemment, une nouvelle technique d'imagerie associée à la mesure de l'élasticité du foie 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. Les résultats sont exprimés en décibels par mètre (dB/m) et varie entre 100 et 400 dB/m (Sasso, Beaugrand et al. 2010). Ce nouveau marqueur s'est avéré performant pour le diagnostic d'une stéatose sévère (>32-66%) avec des AUROCs entre 0.76 à 0.95 (de Ledinghen, Vergniol et al. 2012; Myers, Pollett et al. 2012; Sasso, Miette et al. 2012; Carvalhana, Leitao et al. 2013; Chon, Jung et al. 2013; Kumar, Rastogi et al. 2013; Masaki, Takaki et al. 2013). Le CAP sera discuté en détails dans la partie II de cette thèse.

Chapitre II - Le FibroScan (EchoSens, Paris, France)

L'élastographie transitoire, évaluée par le FibroScan ® (EchoSens, Paris, France), est une méthode non-invasive de diagnostic de la fibrose hépatique chez les patients ayant une maladie hépatique chronique. L'examen est indolore, rapide (moins de 5 minutes) et facilement réalisé en consultation. 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.

II-1. *Caractéristiques techniques*

La sonde transmet des vibrations d'amplitude modérée et à basse fréquence (50 Hz) induisant des ondes de cisaillement élastique qui se propagent à travers le tissu hépatique. La vitesse de propagation de ces ondes, mesurée par la machine, est directement corrélée à la dureté du foie: plus rigide est le tissu, plus rapide est la propagation des ondes de cisaillement (de Ledinghen and Vergniol 2008).

L'examen est réalisé sur un patient à jeun de préférence, allongé en décubitus dorsal avec le bras droit en abduction maximale. La sonde, recouverte de gel, est placée de façon perpendiculaire sur la peau dans un espace intercostal au niveau du lobe droit du foie. L'emplacement le plus fréquent de la sonde est celui où la ponction biopsie hépatique 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 en dehors de grosses structures vasculaires et prend une mesure ("*shot*"). Le logiciel détermine la validité de chaque mesure de l'élasticité du foie. Quand une mesure est considérée comme invalide, elle est automatiquement déchargée. Les valeurs d'élasticité du

foie, exprimées en kilopascals (kPa), peuvent varier de 2.5 à 75 kPa (Castera, Forns 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 l'élastographie transitoire chez les patients pédiatriques et la sonde M chez les sujets de poids normal. La sonde XL a été développée pour mesurer l'élasticité hépatique chez les patients ayant un surpoids ou une obésité, une population dans laquelle la sonde M a une applicabilité relativement faible. La mesure de l'élasticité du foie est mesurée par la sonde M dans le volume d'un cylindre d'un centimètre de large par 4 cm de long et à 25mm de distance de la surface de la peau. La sonde XL permet de mesurer l'élasticité dans le même volume que la sonde M (4 cm³). En revanche, la mesure démarre plus profondément, à partir de 35mm de la surface de la peau jusqu'à 75 mm de profondeur dans le parenchyme hépatique. Les différences techniques spécifiques entre les sondes M et XL comprennent leur fréquence (3.5 par rapport à 2.5 MHz), l'amplitude de vibration (2 par rapport à 3 mm), le diamètre de leur extrémité (9 par rapport à 12 mm), et la profondeur de mesure à partir de la surface de la peau (25 - 65 contre 35-75 mm) (Figure 1).

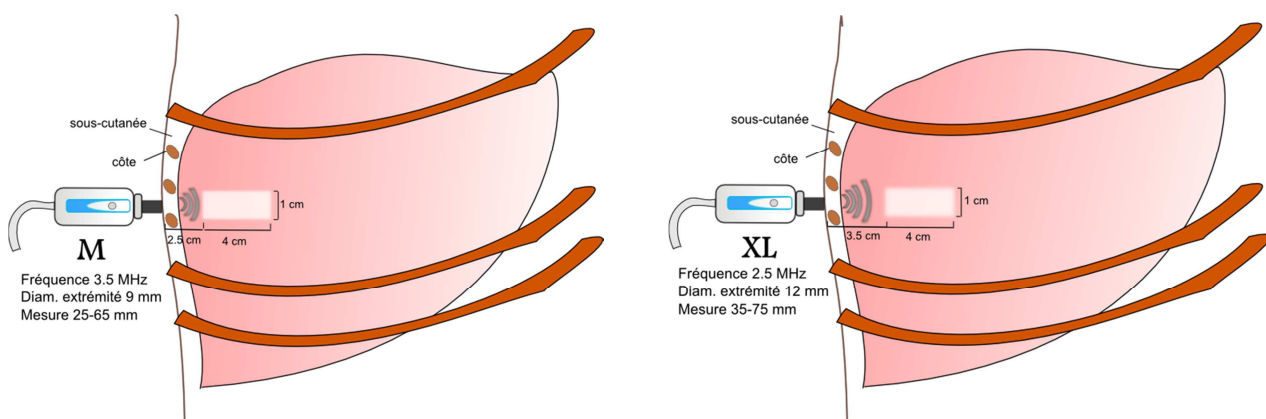


Figure 1. Les différences techniques entre les sondes M et XL de l'élastographie transitoire

II-2. Limitations de l'élastographie transitoire

Les limites de cette méthode sont la proportion relativement élevée d'examens non interprétables, la variabilité inter-observeur et l'influence de plusieurs facteurs sur l'élasticité du foie qui peuvent surestimer le stade de fibrose hépatique.

II-2-1. Applicabilité

L'applicabilité de cette méthode est basée sur l'évaluation de 3 critères: (i) le nombre total de mesures valides; (ii) le rapport entre l'intervalle interquartile ("*Inter-Quartil Range*" - IQR) et la valeur médiane de l'élasticité hépatique et (iii) le taux de réussite (TdR), défini comme nombre de mesures valides par rapport au total des mesures réalisées. On considère l'élastographie transitoire interprétable si tous ces critères sont réunis: 10 mesures valides; le rapport IQR/Médiane < 30% et le TdR > 60% (Poynard, Ingiliz et al. 2008). Le résultat final du test correspond à la médiane de toutes les mesures valides. L'examen est considéré non applicable si les critères décrits ci-dessus ne sont pas respectés (appelé non interprétable ou en anglais "*unreliable*") ou s'il n'y a pas de mesure valide (appelé échec ou en anglais "*failure*") après 10 tentatives de mesure ("*shots*") (Castera, Goutte et al. 2012).

L'applicabilité est une des principales limites de l'élastographie transitoire. Le taux de non applicabilité est généralement aux alentours de 20% (16% des examens non interprétables et 4% d'échec de mesures) avec la sonde M. Les facteurs métaboliques, comme l'obésité et le diabète, sont les principaux facteurs associés à la non applicabilité de cette méthode (Foucher, Castera et al. 2006; Castera, Foucher et al. 2010). La sonde XL a été développée pour améliorer l'utilisation de ce marqueur non invasif chez les patients ayant une NAFLD, souvent associée à de nombreux facteurs métaboliques. Plusieurs études ont comparé la faisabilité des mesures réalisées avec les sondes M et XL dans cette population. La sonde XL a presque

éliminé les échecs de mesure et a beaucoup amélioré l'applicabilité de l'examen, même chez les obèses. L'élasticité mesurée par la sonde XL est significativement inférieure par rapport à celle de la sonde M, mais la performance est similaire pour le diagnostic de fibrose avancée ou de cirrhose avec les deux sondes (de Ledingham, Vergniol et al. 2010; de Ledingham, Wong et al. 2012; Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012; Wong, Vergniol et al. 2012).

Selon EchoSens, il n'est pas recommandé de réaliser l'élastographie transitoire chez les femmes enceintes et les patients porteurs d'un pacemaker. En outre, il n'est pas possible de réaliser l'examen chez les patients qui ont une ascite, un facteur qui peut limiter son applicabilité chez les patients cirrhotiques.

II-2-2. L'effet operateur

L'effet operateur a été initialement démontré dans une étude de l'équipe qui a évalué la concordance entre deux marqueurs non-invasifs, l'élastographie transitoire 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 non applicabilité supérieur à celui d'opérateurs expérimentés (36% versus 29%; $p < 0.01$). La concordance entre les deux marqueurs était également moins bonne lorsque l'élastographie transitoire était réalisée par l'opérateur non expérimenté que lorsque elle était réalisée par un opérateur expérimenté (AUROC 0.70 versus 0.80; $p < 0.01$). Cette conclusion a été confirmée dans une étude prospective au cours de laquelle plus de 13,000 examens ont été évalués: l'expérience de l'opérateur était l'un des facteurs indépendamment associés à la non applicabilité de l'élastographie transitoire (Castera, Foucher et al. 2010).

II-2-3. Reproductibilité

Les premières publications ont rapporté une excellente reproductibilité intra et inter-observateur de l'élastographie transitoire (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007; Boursier, Konate et al. 2008). Cependant, d'autres publications plus récentes ont contredit ces résultats (Neukam, Recio et al. 2010; Roca, Resino et al. 2012). Ces dernières études ont rapporté des mesures de l'élasticité bien corrélées, mais en moyenne, 20% de discordance d'au moins un stade de fibrose entre des examens réalisés par deux opérateurs expérimentés. Il existe une possibilité de variabilité intrinsèque de l'examen, qui s'ajoute à d'autres facteurs confondants, comme la position de la sonde ou la phase respiratoire pendant l'acquisition des mesures (Ingiliz, Chhay et al. 2009). La variabilité du FibroScan va être discutée en détails dans le chapitre IV de cette thèse.

II-2-4. Facteurs associés aux tests "faux positifs"

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 conséquent un faux positif de l'élastographie transitoire. En effet, tous les facteurs capables de changer la densité du foie vont impacter dans l'élastographie transitoire. La présence d'une activité nécrotico-inflammatoire, d'une cholestase extra-hépatique, d'un foie-cardiaque et l'ingestion d'aliments sont les facteurs plus souvent associés à une surestimation de la fibrose du foie.

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). La cholestase extra-hépatique et la congestion vasculaire augmentent l'élasticité du foie indépendamment de la fibrose. 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 prise d'aliments augmente aussi l'élasticité du foie indépendamment du stade de fibrose. Différentes études ont permis de démontrer un pic de l'élasticité hépatique entre 15 et 45 minutes après le 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). L'impact de la stéatose hépatique sur les mesures d'élastographie transitoire est un sujet de controverse qui sera discuté en détail dans le chapitre IV de cette thèse.

II-3. Performance diagnostique de l'élastographie transitoire

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

La performance diagnostique d'une méthode non invasive est évaluée par l'estimation de l'aire sous la courbe ROC, en anglais "area under the receiver operating characteristic curve" (AUROC), en utilisant la biopsie hépatique comme référence. Cependant, il faut prendre en compte la prévalence de la fibrose (appelée "spectrum effect") et le fait que la biopsie du foie n'est pas dichotomique (oui versus non) dans la méthodologie de l'évaluation de la performance diagnostique d'un marqueur non-invasif (Lambert, Halfon et al. 2008).

L'ajustement des AUROCs par la mesure d'Obuchowski prend en compte le "spectrum effect" et la classification ordinaire des stades de fibrose par la biopsie du foie (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 biopsie du foie 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.

Quelques études ont démontré l'importance de l'utilisation de la mesure d'Obuchowski pour ajuster les AUROCs au cours de la validation d'un marqueur non invasif. La définition retenue de la fibrose avancée a un fort impact dans la performance d'un marqueur non invasif. Dans une étude de l'équipe, les AUROCs pour la performance du FibroTest ont varié de 0.67 à 0.98 en fonction de la définition de fibrose avancée versus non avancée (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 versus 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 le FibroTest peut s'appliquer à n'importe quel marqueur non invasif de fibrose hépatique.

. Une autre étude de l'équipe a évalué l'impact de la prévalence de la fibrose sur la performance diagnostique de l'élastrographie transitoire (Poynard, de Ledinghen et al. 2011). Dans cette étude les auteurs ont évalué la performance de cette méthode dans une population de patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) et des volontaires sains. L'AUROC pour le diagnostic d'une fibrose avancée, définie par F2F3F4 de 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 augmenté 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 versus 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.

En conclusion, il est obligatoire d'ajuster les AUROCs pour la prévalence de la fibrose, souvent en utilisant la mesure d'Obuchowski, pour évaluer la performance diagnostique d'un marqueur non-invasif de fibrose hépatique.

II-3-2. Au cours des maladies chroniques du foie hors stéatopathie non-alcoolique

La valeur diagnostique de l'élastographie transitoire et ses seuils pour l'estimation de la fibrose ont été établis en utilisant la biopsie hépatique comme référence. Cependant, dans la plupart des études, la performance de ce marqueur a été évaluée sans l'ajustement des AUROCs pour la mesure d'Obusowski. Par conséquent, la performance diagnostique de la méthode a été influencée par la prévalence de la fibrose dans chaque étude et le fait que la biopsie du foie n'est pas dichotomique (Lambert, Halfon et al. 2008). Différents seuils ont été décrits par les auteurs en fonction de la maladie hépatique (Figure 2).

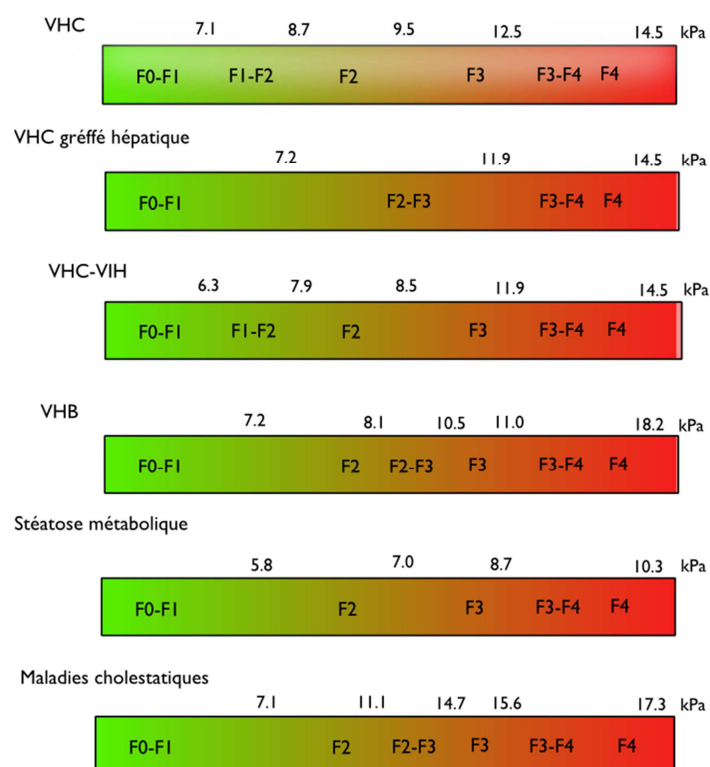


Figure 2. Les seuils proposés pour l'estimation de la fibrose hépatique par élastographie transitoire.

En général, la mesure de l'élasticité du foie est fortement corrélée aux stades de fibrose estimés par la classification de METAVIR (1994) à la biopsie hépatique. Les AUROCs varient entre 0.79 et 0.92 pour le diagnostic d'une fibrose significative (METAVIR $F \geq 2$) 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 1)

Tableau 1. La performance diagnostique de l'élastographie transitoire pour le diagnostic d'une fibrose significative et d'une cirrhose chez les patients ayant une maladie hépatique chronique.

Auteurs	n	Maladie hépatique	Fibrose Significative (F $\geq$ 2) AUROC	Cirrhose (F $\geq$ 4) AUROC
(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	-	0.97
(Vergara, Macias et al. 2007)	169	VHC-VIH	0.83	0.94
(Carrion, Navasa et al. 2006)	124	VHC greffé hépatique	0.90	0.98
(Rigamonti, Donato et al. 2008)	90	VHC greffé hépatique	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
(Miaillhes, 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 les maladies	0.80	0.96
(Gomez-Dominguez, Mendoza et al. 2006)	94	Toutes les maladies	0.74	0.94
(Fraquelli, Rigamonti et al. 2007)	200	Toutes les maladies	0.86	0.90
(Wong, Wong et al. 2008)	133	Toutes les maladies	-	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.

Différentes méta-analyses ont validé la performance diagnostique d'elastographie transitoire (Tableau 2). 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'Obuchowski (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 2. La performance diagnostique de l'élastographie transitoire évaluée par des méta-analyses

Auteur	Maladie	Etudes	N total	wAUROC	F $\geq$ 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.

II-3-3. Au cours de la stéatose stéatopathie non-alcoolique

Plusieurs études ont évalué l'élastographie transitoire pour l'estimation de la fibrose hépatique chez les patients ayant une NAFLD en utilisant la biopsie hépatique comme référence. Comme observé pour les autres maladies chroniques hépatiques, cette méthode a été très performante pour le diagnostic d'une fibrose significative (F $\geq$ 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 (Table 3). Cependant, comme pour la validation de la méthode dans d'autres maladies hépatiques chroniques, les auteurs n'ont pas pris en compte le "*spectrum effect*". En plus, les études ont été portées sur des populations hétérogènes et inhabituelles (comme des asiatiques sans obésité), très peu des patients cirrhotiques ont été inclus, l'élastographie transitoire a été comparée à la biopsie hépatique en utilisant des classifications histologiques différentes (Kleiner, Brunt et al. 2005) et (Brunt, Janney et al. 1999) et plusieurs seuils ont été proposés.

Tableau 3. La performance diagnostique de l'élastographie transitoire pour le diagnostic d'une fibrose significative ou d'une cirrhose chez les patients ayant une NAFLD confirmé par biopsie hépatique.

Etude	n	Classification Histologique	Fibrose significative (F≥2)		Cirrhose (F≥4)	
			Seuil (kPa)	AUROC	Seuil (kPa)	AUROC
(Yoneda, Mawatari et al. 2008)	97	Brunt	6.6	0.86	17.5	0.99
(Nobili, Vizzutti et al. 2008)	50	Brunt	7.4	0.99	-	-
(Wong, Vergniol et al. 2010)	246	Kleiner	7.0	0.84	10.3	0.95
(Lupsor, Badea et al. 2010)	65	Brunt	6.8	0.79	-	-
(Petta, Di Marco et al. 2011)	146	Kleiner	7.2	0.79	-	-
(Gaia, Carenzi et al. 2011)	72	Brunt	7.0	0.80	10.5	0.94
(Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012)	75	Kleiner	7.8	0.86	22.3	0.88
(Wong, Vergniol et al. 2012)	129	Kleiner	7.0	0.83	10.3	0.89

Les effectifs (n) représentent les patients avec élastographie transitoire interpretable. AUROC, *area under the receiver operator curve*, kPa; KiloPascals (Adapté de Castera 2013 - Nature reviews)

La performance diagnostique des sondes M et XL était similaire dans les études qui ont comparé les deux sondes (Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012; Wong, Vergniol et al. 2012). Cependant, 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 une maladie métabolique. Comme la mesure 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 $F \geq 2$; 7.9kPa (XL) et 10.3 kPa (M) pour le diagnostic d'une cirrhose ($F=4$) (Wong, Vergniol et al. 2012).

II-4. La valeur pronostique de l'élastographie transitoire

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 entraîner une réduction de la survie globale (2010; 2012).

La mesure de l'élasticité 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). Cette méthode non-invasive est performante pour la prédiction des complications hépatiques graves et de la mortalité globale et d'origine hépatique (Singh, Fujii et al. 2013). Une des ses limites est l'applicabilité réduite surtout chez les patients ayant une ascite. Cette méthode permet également de prédire la mortalité globale dans l'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 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). (Figure 3)

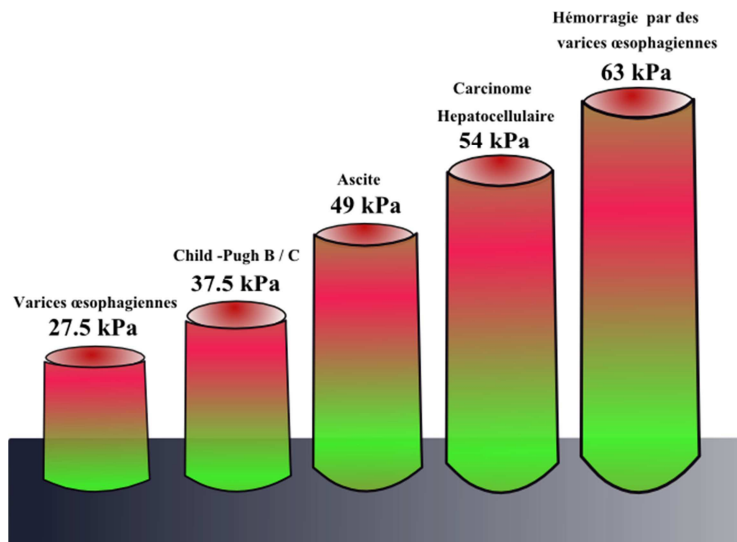


Figure 3. Seuils proposés pour la prédiction des complications d'une cirrhose

Plus récemment, une étude de l'équipe a été validé l'élastographie transitoire pour la prédiction des complications chez les patients ayant une cirrhose. Ce travail de l'équipe 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 transitoire chez les patients ayant des maladies chronique du foie. Les différents seuils de l'élastographie transitoire 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 4). 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 ≥ 10 mmHg (Colecchia, Montrone et al. 2012). Cependant, ce résultat doit être validé par d'autres études, d'autant que l'élastographie transitoire 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 4. La performance de l'élastographie transitoire pour la prédiction de l'hypertension portale.

Etude	Maladie hépatique	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
(Robic, Procopet et al. 2011)					
(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 transitoire est une méthode simple, rapide, non-invasive, validée pour l'estimation de la fibrose hépatique dans les maladies chroniques du foie. Cette méthode est performante pour le diagnostic 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, les examens doivent être réalisés par des opérateurs expérimentés et les résultats doivent être interprétés par des médecins spécialistes prenant en compte le contexte clinico-biologique du patient et les limites de la méthode.

II-5. La mesure du CAP ("Controlled Atenuatted Parameter")

Le CAP est une nouvelle technique qui a été développée pour estimer la stéatose hépatique avec l'élasticité du foie simultanément 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. Cette méthode 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 de l'élastographie transitoire (Sasso, Beaugrand et al. 2010).

Le CAP est estimé uniquement sur les mesures valides et par les mêmes ondes de cisaillement qui permettent de mesurer de l'élasticité du foie. Par conséquent le CAP estime la stéatose hépatique simultanément à l'élastographie hépatique et dans le même volume de parenchyme hépatique. Cette technique est disponible uniquement 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 transitoire (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).

Plusieurs études ont validé la mesure du CAP pour l'estimation de la stéatose hépatique (table 5). Ces études ont montré que le CAP était bien corrélé à la quantité de stéatose et que sa mesure n'était pas influencée par le stade de fibrose. Cependant, les auteurs ont évalué des populations hétérogènes, asiatiques pour deux d'entre elles, la majorité avec un IMC < 30 Kg/m² et un effectif faible de patients "métaboliques". Les études ont utilisé des classifications histologiques distinctes et n'ont pas pris en compte la prévalence de la stéatose, appelé le "*spectrum effect*". Par conséquent plusieurs seuils ont été proposés pour l'estimation de la stéatose. Le CAP était reproductible selon la seule étude qui a évalué la variabilité inter-observateur (Recio, Cifuentes et al. 2013). Les contraintes de la mesure du CAP en pratique clinique sont l'applicabilité limitée de la sonde M chez les patients obèses et l'indisponibilité de la sonde XL pour cette application. Les facteurs associés au non applicabilité du CAP sont similaires à ceux de l'élastographie transitoire car le CAP et l'élasticité hépatique sont mesurés.

Tableau 5. La performance diagnostique du CAP pour l'estimation de la stéatose hépatique.

Etude	n	Maladie hépatique	NAFLD	IMC (Kg/m ²)	Non applic	Référence	Stéatose	Prévalence de la stéatose	Seuil (dB/m)	AUROC
(Sasso, Beaugrand et al. 2010) France	115	Toutes	15%	25	-	PBH	>11%	58%	238	0.91
							>33%	39%	260	0.95
							>66%	8%	282	0.89
(Myers, Pollett et al. 2012) Canada	153	Toutes	47%	32	31%	PBH	>5%	74%	289	0.79
							>10%	-	283	0.81
							>33%	35%	288	0.76
							>66%	10%	283	0.70
(Sasso, Miette et al. 2012) France	615	VHC	-	24.1	10%	PBH	>11%	31%	222	0.80
							>33%	13%	233	0.86
							>66%	1%	290	0.88
(de Ledinghen, Vergniol et al. 2012) France	112	Toutes	25%	25.8	8%	PBH	>11%	51%	263	0.84
							>33%	31%	311	0.86
							>66%	15%	400	0.93
(Kumar, Rastogi et al. 2013) Inde	63	Stéatose métabolique	100%	25.1	-	PBH	>5%	-	-	-
							>33%	59%	258	0.79
							>66%	11%	283	0.76
(Chon, Jung et al. 2013) Corée du sud	135	Toutes	42%	24.4	4%	PBH	>5%	69%	250	0.89
							>33%	25%	299	0.89
							>66%	7%	327	0.80
(Masaki, Takaki et al. 2013) Japon	155	Toutes	26%	24.4	-	PBH	>5%	35%	233	0.88
(Carvalhana, Leitao et al. 2013) Portugal	206	Population general	24%	27.2	6%	Echo	Stéatose	38%	243	0.94
							Stéatose sévère	14%	303	0.95

AUROC, area under the ROC curve; IMC, indice de massa corporelle; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; PBH, ponction biopsie hépatique; VHC, virus de l'hépatite C

En résumé le CAP est une nouvelle technique pour l'estimation non-invasive de la stéatose hépatique. C'est une méthode simple et rapide réalisé simultanément à l'estimation

de l'élasticité du foie. Cependant, la contrainte principale est le taux élevé de non applicabilité chez les patients obèses à cause de sa disponibilité seulement dans la sonde M. En plus d'autres études sont encore nécessaires pour évaluer sa variabilité et facteurs associés à des résultats faux positives et faux négative de la mesure.

Chapitre III - Le FibroMax (BioPredictive, Paris, France)

Le FibroMax (Biopredictive, Paris, France) est la combinaison de cinq biomarqueurs non-invasifs: le FibroTest, l'ActiTest, le SteatoTest, le NashTest et l'AshTest. Le FibroMax est un examen breveté qui appartient à l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP, Paris, France) et qui est commercialisé par BioPredictive ® (Paris, France). Le FibroTest, l'ActiTest et le SteatoTest estiment de façon respective la fibrose, l'activité inflammatoire et la stéatose hépatique, respectivement. Le NashTest et l'AshTest estiment l'éventualité possibilité d'une stéatohépatite métabolique et alcoolique, respectivement. 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'un algorithme informatique sécurisé selon des procédures pré-analytiques et analytiques définies (Poynard, Muntenau et al. 2008). Les résultats de chaque biomarqueur est une valeur allant de 0 à 1.00, les scores les plus élevés étant attribués aux lésions les plus sévères.

Le FibroTest comprend l'alpha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotéine-A1, la bilirubine totale et le gamma glutamyl transférase (GGT) ajusté par l'âge et le sexe. (Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001; Halfon, Munteanu et al. 2008). L'ActiTest comprend les mêmes paramètres que ceux du FibroTest combiné à l'alanine aminotransférase (ALAT) (Halfon, Munteanu et al. 2008). Le SteatoTest (Poynard, Ratziu et al. 2005), le NashTest (Poynard, Ratziu et al. 2006) et l'AshTest (Thabut, Naveau et al. 2006) comprennent les mêmes paramètres que ceux du FibroTest-ActiTest combiné à l'aspartate aminotransférase (ASAT), la glycémie à jeun, le cholestérol total et les triglycérides ajustés par l'âge, le sexe et l'IMC.

III-1. Rationnel scientifique

Les premiers biomarqueurs rapportés du FibroMax ont été le FibroTest et l'ActiTest. Ces biomarqueurs sont nés d'une expérience clinique en 2001 suivie par des centaines de publications scientifiques les ont depuis validés. Quelques années plus tard les biomarqueurs des maladies hépatiques métabolique et alcoolique, le SteatoTest, le NashTest et l'AshTest, ont été développés. Chaque composant du FibroMax repose sur un rationnel scientifique. Le développement de la fibrose hépatique reflète un déséquilibre dans les processus de production et de dégradation de la matrice extracellulaire (Riley, Taheri et al. 2009). L'inflammation, les remaniements sinusoidaux et la cholestase sont autant de facteurs impliqués dans le développement et la progression de la fibrose hépatique (Friedman 1999). L'accumulation anormale de graisse dans les hépatocytes est due à la consommation d'alcool ou à des facteurs métaboliques.

Les trois protéines prises en compte dans le FibroTest, alpha-2-macroglobuline (A2M), l'haptoglobine et l'apolipoprotéine-A1 (Apo-A1) sont synthétisées par les hépatocytes. L'augmentation d'A2M est provoquée par l'inflammation et la diminution des deux autres protéines, l'haptoglobine et l'Apo-A1, par des altérations fonctionnelles hépatocytaires. Plusieurs travaux de l'équipe et d'auteurs indépendants ont rapporté la corrélation positive de la concentration sérique d'A2M (Naveau, Poynard et al. 1994; Tiggelman, Linthorst et al. 1997) et la corrélation négative des concentrations sériques d'haptoglobine (Bacq, Schillio et al. 1993; Louagie, Brouwer et al. 1996) et d'Apo-A1 (Poynard, Abella et al. 1986; Bedossa, Poynard et al. 1989; Poynard, Bedossa et al. 1995; Mathurin, Vidaud et al. 1996; Paradis, Mathurin et al. 1996) à la fibrose hépatique. L'A2M et l'Apo-A1 ont des concentrations sériques également augmentées au cours de la NAFLD ou de la NASH (Ratziu, Massard et al. 2006).

La GGT et la bilirubine totale sont respectivement associées aux stades précoces et tardifs de la cholestase. La GGT est une enzyme synthétisée par les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires très sensible à la cholestase et qui augmente en présence de fibrose hépatique. La valeur prédictive négative de cette enzyme est très importante pour l'exclusion d'une fibrose avancée ou d'une cirrhose. La bilirubine est le produit de dégradation de l'hémoglobine. Dans les hépatocytes la bilirubine est conjuguée avant être excrétée dans la bile (Muraca, Fevery et al. 1988). La bilirubine augmente aux stades avancés de maladie du foie, et notamment de fibrose.

Les transaminases, l'ALAT et l'ASAT, sont des enzymes synthétisées par les hépatocytes qui augmentent en présence d'une réaction nécrotico-inflammatoire du foie (Pradat, Alberti et al. 2002). Finalement, les concentrations sériques élevées des triglycérides, du cholestérol, et de la glycémie sont associés aux maladies métaboliques, notamment à la présence d'une stéatose hépatique (Bellentani, Saccoccio et al. 2000; Loguercio, De Simone et al. 2004).

III-2. Procédures pré-analytique et analytique

III-2-1. La procédure pré-analytique

La mesure des paramètres du FibroMax doit être faite de préférence sur du sérum ou plasma frais ou conservés entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière durant maximum 4 jours. Il est fortement recommandé d'utiliser le tube pour sérum fluoré (bouchon gris), contenant l'inhibiteur de l'hexokinase, pour mesurer la glycémie à jeun. Cette procédure empêche le métabolisme du glucose par les globules rouges. Les mesures rétrospectives doivent être réalisées sur du sérum ou plasma congelés à -80°C pour éviter les faux positifs ou faux négatifs des biomarqueurs (Munteanu, Imbert-Bismut et al. 2010). L'échantillon doit être

centrifugé à 15.000 g pendant 10 minutes après décongélation pour la mesure des paramètres et calcul du FibroMax.

La mesure des paramètres du FibroMax doit être réalisée sur des automates calibrés en utilisant des réactifs normalisés à partir d'un matériel de référence. Les paramètres ne doivent pas être exprimés en multiples de la limite supérieure de la valeur de référence (ou normale). Les automates et les kits agréés par BioPredictive doivent être utilisés pour mesurer les paramètres biologiques individuels du FibroMax (Halfon, Imbert-Bismut et al. 2002; Ferard, Imbert-Bismut et al. 2005; Imbert-Bismut, Messous et al. 2005; Piton, Messous et al. 2005; Ferard, Piton et al. 2006).

III-2-2. La procédure analytique

Le FibroMax doit être calculé à partir des paramètres qui ont été mesurés en respectant la procédure pré-analytique. Le calcul des biomarqueurs du FibroMax (FibroTest; ActiTest; SteatoTest; NashTest et AshTest) sont réalisés dans un algorithme sécurisé qui est basé sur l'influence des valeurs extrêmes (les "outliers") des paramètres sur l'estimation des lésions hépatiques. Les valeurs extrêmes de chaque paramètre sont considérés comme ceux qui sont au-delà du percentile 98% en tenant en compte de la distribution normale en bilatéral de ce paramètre (1% du percentile inférieur et 1% du percentile supérieur). Le test est considéré comme non interprétable en présence d'une valeur extrême d'un paramètre entraînant une variation d'au moins 0.30 unité au biomarqueur. La variation de 0.30 unité du biomarqueur correspond à la variation d'un stade et demi (1.5 stades) selon la classification histologique (Poynard, Munteanu et al. 2011). La présence de paramètres ayant des valeurs extrêmes qui n'entraînent pas cette variation de 0.30 unité n'invalidé pas le test. En revanche, il y a dans ce cas un risque de faux positif ou faux négatif, en fonction du paramètre ayant une valeur

extrême. Ces risques sont affichés sur la forme d'avertissements ("*Warnings*") dans le résultat du test qui doivent être interprétés par le clinicien.

Les valeurs de références des paramètres du FibroMax ont été définies à partir de la distribution normale observée au laboratoire de référence du Service de Biochimie du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière pendant les premières études de l'équipe chez les patients ayant une hépatite chronique C (Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001), une hépatite chronique B (Myers, Tainturier et al. 2003), une maladie hépatique alcoolique (Naveau, Raynard et al. 2005) ou une NAFLD (Ratziau, Massard et al. 2006).

III-3. Applicabilité et Reproductibilité

Le FibroMax est considéré comme interpreable en l'absence de valeur extrême d'un paramètre qui peut modifier artificiellement le résultat. L'applicabilité du FibroMax, évalué parmi plus de 350,000 tests réalisés mondialement est supérieure à 95%, constituant un des grands avantages de cette méthode (Poynard, Munteanu et al. 2011). Les résultats comportant la présence de "*Warnings*" sont considérés comme interprétables. En revanche, ces tests doivent être considérés en fonction du contexte clinique en raison du risque de faux positif ou faux négatif.

Le FibroMax a une bonne reproductibilité intra et interobservateur. La variabilité inter-laboratoire des paramètres utilisés dans le FibroMax est extrêmement faible. Les concentrations de protéines utilisées dans le test n'ont pas montré de variabilité significative entre 8 laboratoires et le laboratoire de référence du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière dans une étude de l'équipe comparative. En revanche, l'ALAT a montré une variabilité inter-laboratoire importante, ses concentrations sériques étant plus élevés dans les laboratoires qui comme le laboratoire référence avaient utilisé le phosphate de pyridoxal, (Halfon, Imbert-

Bismut et al. 2002). La variabilité intra-individuelle de cette méthode n'est pas significative. L'étude au cours de laquelle la mesure des paramètres du FibroTest-ActiTest était répétée dans le même échantillon après quatre jours, a montré une discrète variabilité des paramètres sans impact sur le résultat du test (Imbert-Bismut, Messous et al. 2004).

Le FibroTest et l'ActiTest, ainsi que leurs composants, ne sont pas significativement influencés par la prise d'un repas (à jeun versus non à jeun). Cependant, les autres biomarqueurs du FibroMax, en particulier le SteatoTest et le NashTest incluent des paramètres qui doivent être impérativement dosés à jeun (la glycémie, le cholestérol et les triglycérides) en raison de la variation significative de leurs concentrations sériques après l'alimentation (Munteanu, Messous et al. 2004; Poynard, Ratziu et al. 2005).

III-4. Facteurs associés aux faux positifs ou faux négatifs

Le risque de faux résultats est associé à la présence de valeurs extrêmes des paramètres. La prévalence des valeurs extrêmes du FibroTest-ActiTest a été très faible dans une étude préliminaire qui a analysé plus de 32,000 tests (Tableau 6) (Munteanu, Ratziu et al. 2004)

Tableau 6. Prévalence des valeurs extrêmes des paramètres du FibroTest-ActiTest chez 32,527 patients ayant une hépatite chronique C.

	Valeur inférieure au percentile 1%		Valeur supérieure au percentile 99%		Valeurs entre les percentiles 1%-99%
Alpha-2 macroglobuline, g/L	1.1	675 (2.08%)	5.0	449 (1.38%)	31 403 (96.54%)
Haptoglobine, g/L	0.12	1589 (4.89%)	3.2	128 (0.39%)	30 810 (94.72%)
Apolipoprotéine A1, g/L	0.73	613 (1.88%)	2.5	165 (0.51 %)	31 749 (97.61%)
Bilirubin Total, umol/L	3	772 (2.37%)	50	464 (1.43%)	31 291 (96.20%)
GGT, U/L	8	212 (0.65%)	1 140	84 (0.26%)	32 231 (99.09%)
ALAT, U/L	14	1087 (3.34%)	622	114 (0.35%)	31 326 (96.31%)

Le risque d'un FibroTest faux-positif ou faux négatif est très faible selon une étude de l'équipe qui a évalué plus de 350,000 tests réalisés par BioPredictive. Ce risque varie entre 0.51% (95%IC 0.36-0.70) chez les volontaires sains et les donneurs de sang à 1.97% (95% IC 1.80-2.15) chez les patients suivis dans le Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière. Les patients ayant une infection par le VIH [1.77% (95% IC 1.30-2.35) et les patients d'origine subsaharienne [2.61% (95% IC 0.96-5.59) sont les populations à haut risque des faux résultats (Poynard, Munteanu et al. 2011).

Les causes les plus fréquentes d'un FibroTest faux-négatif sont les concentrations d'haptoglobine (≥ 3.20 g/L) et d'Apo-A1 (≥ 2.50 g/L) à la limite supérieure de la normale ou d'A2M (≤ 0.80 g/L) à la limite inférieure de la normale. L'inflammation systémique (ou *sepsis*) est la cause la plus fréquente d'une augmentation d'haptoglobine. L'ascite volumineuse et la dénutrition causent une réduction d'A2M avec un risque de faux-négatif du Fibrotest.

Les causes de faux positif du FibroTest sont les concentrations d'haptoglobine très faibles, à la limite inférieure de la normale (≤ 0.08 g/L), et de bilirubine totale très élevées, à la limite supérieure de la normale (≥ 50 μ mol/L). La présence d'une hémolyse est la cause la plus fréquente d'une réduction d'haptoglobine, en cas notamment de prothèse cardiaque métallique, de traitement par la ribavirine ou de maladies comme la drépanocytose ou l'anémie hémolytique auto-immune. Le syndrome de Gilbert, une altération héréditaire multifactorielle associée à une concentration sérique élevée de bilirubine non conjuguée est provoquée par une diminution d'origine génétique de l'activité d'une enzyme hépatique, l'UDP glycuronyl transférase (Bosma, Chowdhury et al. 1995) et sa prévalence est de l'ordre de 6% dans la population générale (Owens and Evans 1975). L'hémolyse et la maladie de Gilbert sont une des causes les plus fréquentes de faux-positif du FibroTest.

III-5. La performance diagnostique

III-5-1. FibroTest

Le tableau 7 résume les seuils du FibroTest et la conversion entre le score et les stades de fibrose selon l'histologie hépatique.

Tableau 7. Conversion entre les scores du FibroTest et les stades de fibrose selon les classifications histologiques de METAVIR (1994) et Ishak (Ishak, Baptista et al. 1995).

FibroTest	Stade de fibrose estimé par le FibroTest	Stade de fibrose selon le score de METAVIR	Stade de fibrose selon le score de Ishak
0.7401-1.0000	F4	F4	F6
0.7201-0.7400	F3-F4	F3	F5
0.5801-0.7200	F3	F3	F4
0.4801-0.5800	F2	F2	F3
0.3101-0.4800	F1-F2	F1	F2
0.2701-0.3100	F1	F1	F2
0.2100-0.2700	F0-F1	F0	F1
0.0000-0.2100	F0	F0	F0

Comme pour la plupart des marqueurs non-invasifs de fibrose, l'évaluation de la performance diagnostique du FibroTest a été réalisée en utilisant la biopsie du foie comme référence. Cette démarche a généré des problèmes méthodologiques majeurs. D'abord, cette méthode considère le résultat de la biopsie comme une variable binaire alors que les patients sont classés selon une échelle ordinale (par exemple, F0-F1-F2-F3-F4). La classification des patients en deux classes, normale ou fibrose avancée, entraîne donc des biais importants. De plus, l'utilisation des courbes ROC ne prend pas en compte la prévalence de la fibrose dans les populations étudiés, le "*spectrum effect*" (Lambert, Halfon et al. 2008).

La prévalence de la fibrose impacte sur l'analyse de la performance diagnostique du FibroTest pour l'estimation de la fibrose du foie (Poynard, Halfon et al. 2007). Les courbes

ROCs pour l'évaluation de la fibrose hépatique par le FibroTest ont varié entre 0.67 et 0.98 selon la définition de fibrose avancée. La performance diagnostique était meilleure lorsque les auteurs ont évalués les patients sans fibrose (F0) par rapport aux cirrhotiques (F4). Cependant, en analysant l'échantillon des patients ayant une fibrose intermédiaire (F1 versus F2), la performance diagnostique du test était modeste (AUROC de 0.67). L'influence de la prévalence de la fibrose a également été observée en utilisant l'élastographie transitoire comme marqueur non invasif (Poynard, de Ledinghen et al. 2011). En conclusion, les études au cours desquelles la prévalence des patients ayant des stades F0 et F4 est élevée, démontrent nécessairement d'excellentes performances diagnostiques des tests non-invasifs. En revanche, lorsque les pourcentages de patients ayant des stades intermédiaires de fibrose (F2/F3) est important, les performances diagnostiques sont plus modestes.

La plupart des études de l'équipe portant sur la performance diagnostique du FibroTest ont utilisé la méthode statistique d'Obuchowski qui prend en compte la prévalence de la fibrose et le fait que le résultat de la biopsie n'est pas binaire (Obuchowski 2006). Plusieurs études ont validé la performance diagnostique du FibroTest. Les AUROCs non-ajustés pour l'estimation de la présence d'une fibrose $\geq$ F2 de METAVIR ont varié entre 0.71 et 0.87 en fonction de la population étudiée et de la prévalence de la fibrose. (Tableau 8)

Tableau 8. Performance diagnostique du FibroTest chez les patients ayant une maladie hépatique chronique

Auteurs	n	Méthodologie	Stage (Prevalence)	AUROC
Hépatite C				
(Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001)	189	Prospective	F2F3F4 (38%)	0.84
(Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001)	134	Prospective	F2F3F4 (45%)	0.87
(Poynard, McHutchison et al. 2003)	352	Retrospective	F2F3F4 (39%)	0.73
(Rossi, Adams et al. 2003)	125	Prospective	F2F3F4 (39%)	0.74
(Myers, Benhamou et al. 2003)	130	Retrospective co-infection VIH	F2F3F4 (45%)	0.86
(Castera, Vergniol et al. 2005)	183	Prospective	F2F3F4 (38%)	0.85
(Cales, Oberti et al. 2005)	120	Prospective	F2F3F4 (48%)	0.86
(Varaut, Fontaine et al. 2005)	60	Retrospective greffés rénales	F2F3F4 (48%)	0.71
(Halfon, Bourliere et al. 2006)	504	Prospective	F2F3F4 (45%)	0.79
(Sebastiani, Vario et al. 2006)	65	Prospective	F2F3F4 (39%)	0.71
(Sebastiani, Vario et al. 2006)	125	Prospective	F2F3F4 (71%)	0.81
(Wilson, Torbenson et al. 2006)	115	Retrospective	F2F3F4 (38%)	0.74
(Sene, Limal et al. 2006)	258	Prospective	F2F3F4 (47%)	0.83
(Poynard, de Ledinghen et al. 2012)	1289	Retrospective	F2F3F4 (61%)	0.75
Hépatite B				
(Myers, Benhamou et al. 2003)	209	Prospective (n=42) Retrospective (n=167)	F2F3F4 (29%)	0.78
(Poynard, Zoulim et al. 2005)	214	Prospective	F2F3F4 (45%)	0.77
Maladie alcoolique du foie				
(Naveau, Raynard et al. 2005)	221	Prospective	F2F3F4 (64%)	0.84
NAFLD				
(Ratziau, Massard et al. 2006)	170	Prospective	F2F3F4 (24%)	0.86
(Ratziau, Massard et al. 2006)	97	Prospective	F2F3F4 (15%)	0.75

La performance diagnostic du FibroTest a été également validée dans une méta-analyse avec des données individuelles des 3,282 patients. Les AUROCs du FibroTest ajustés par la mesure d'Obuchowski (wAUROC) ont été entre 0.83 et 0.85 en fonction de la maladie chronique du foie (Tableau 9).

Tableau 9. La performance diagnostique du FibroTest ajusté pour le spectrum effect (Poynard, Munteanu et al. 2011)

Maladie	n	F0 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	AUROC 95%IC	wAUROC 95%IC
Hépatite C	2431	204 (8.4)	1123 (46.2)	531 (21.8)	298 (12.3)	275 (11.3)	0.77 0.75-0.79	0.83 0.81-0.85
Hépatite B	322	86 (26.7)	94 (29.2)	61 (18.9)	38 (11.8)	43 (11.4)	0.81 0.76-0.86	0.83 0.78-0.88
Maladie alcoolique	262	18 (6.9)	67 (25.6)	50 (19.1)	23 (8.8)	104 (39.7)	0.85 0.80-0.89	0.85 0.80-0.89
Stéatose métabolique	267	102 (38.2)	94 (35.2)	35 (13.1)	23 (8.6)	13 (4.9)	0.81 0.74-0.86	0.84 0.77-0.89
Toutes les maladies	3282	410 (12.5)	1378 (42.0)	677 (20.6)	382 (11.6)	435 (13.3)	0.79 0.77-0.80	0.84 0.82-0.86

Plusieurs méta-analyses ajustées et non-ajustées pour la prévalence de la fibrose ont été publiées pour l'évaluation diagnostique du Fibrotest chez les patients ayant une maladie chronique du foie (Tableau 10). Parmi les méta-analyses, la valeur diagnostique du FibroTest a été également validée dans la NAFLD chez les patients obèses morbides (Poynard, Lassailly et al. 2012).

Tableau 10. La performance diagnostique du FibroTest rapporté par des méta-analyses.

Auteurs	Maladie	n études	n patients	wAUROC (95%IC)	F $\geq$ 2 AUROC (95% IC)	F=4 AUROC (95% IC)
(Shaheen, Wan et al. 2007)	VHC	9	1679	-	0.81 (0.78-0.84)	0.90 (-)
(Poynard, Morra et al. 2007)	Toutes	30	6378	0.84 (0.83-0.86)	-	-
(Leroy, Halfon et al. 2008)	VHC	4	825	-	0.80 (0.77-0.82)	0.89 (0.86-0.92)
(Halfon, Munteanu et al. 2008)	Toutes	38	7985	0.84 (0.83-0.86)	-	-
(Poynard, Ngo et al. 2011)	VHB	8	1842	0.84 (0.79-0.86)	-	-
(Poynard, de Ledinghen et al. 2011)	VHC	3	1289	0.86 (0.85-0.87)	-	-
(Poynard, Lassailly et al. 2012)	Stéatose métabolique	3	494	0.85 (0.83-0.87)	-	-
(Chou and Wasson 2013)	VHC	25	-	-	0.79 (0.70-0.89)	0.86 (0.71-0.92)

III-5-2. ActiTest

L'ActiTest est le biomarqueur utilisé pour estimer l'activité nécrotico-inflammatoire hépatique. Il comprend les mêmes paramètres que ceux du FibroTest combiné à l'alanine aminotransférase (ALAT) (Halfon, Munteanu et al. 2008). Le tableau 11 résume les seuils du biomarqueur et la conversion entre le score et les grades d'inflammation selon l'histologie.

Tableau 11. Conversion entre les scores de l'ActiTest et les grades d'activité inflammatoire selon les classifications histologiques de METAVIR (1994) et Ishak (Ishak, Baptista et al. 1995)

ActiTest	Grade d'activité estimé par l'ActiTest	Stade de fibrose selon le score de METAVIR	Stade de fibrose selon le score de Ishak
0.6201-1.0000	A3	A3	A4
0.6001-0.6200	A2-A3	A2	A3
0.5201-0.6000	A2	A2	A2
0.3601-0.5200	A1-A2	A1	A1
0.2901-0.3600	A1	A1	A1
0.1701-0.2900	A0-A1	A0	A0
0.0000-0.1700	A0	A0	A0

La performance diagnostique de l'ActiTest a été initialement évaluée dans 4 populations rapportées dans deux publications. Les AUROCs ont varié entre 0.75 et 0.86 pour le diagnostic de l'activité nécrotico-inflammatoire significative, grades A2A3 du score METAVIR (Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001; Poynard, McHutchison et al. 2003). Des AUROCs entre 0.64 et 0.83 ont été rapportés par des auteurs indépendants (Halfon, Bourliere et al. 2006; Morali, Maor et al. 2007; Fontanges, Bailly et al. 2008; Anastasiou, Alisa et al. 2010). Cette performance a été validée par une publication qui a évalué les données individuelles de 1,250 patients ayant une hépatite chronique C et une méta-analyse de 6 études (Poynard, Munteanu et al. 2010). L'analyse des données individuelles a permis de montrer l'AUC de 0.74 (95% IC 0.70-0.75) pour le diagnostic d'une activité inflammatoire A2A3. Le wAUC, ajusté par la mesure d'Obuschowski, était de 0.85 (95% IC 0.84-0.86) et ce biomarqueur était plus performant que le marqueur standard de l'inflammation hépatique, l'ALAT (wAUC=0.83; p=0.008) chez les patients ayant une hépatite chronique C.

Plus récemment, l'ActiTest a été validé pour le diagnostic de la présence d'une stéato-hépatite chez 494 patients obèses morbides ayant une NAFLD. Les auteurs ont rapporté une

AUROC standard de 0.74 (95% IC 0.68-0.79) et celle ajusté par la mesure d'Obuschowski de 0.84 (95% IC 0.82-0.86) (Poynard, Lassailly et al. 2012).

Tableau 12. La performance diagnostique de l'ActiTest dans l'hépatite chronique C

Auteurs	n	Méthodologie	Stage (Prevalence)	AUROC (95%IC)
(Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001)	189	Prospective	A2A3 (33%)	0.79 (0.73-0.85)
(Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001)	134	Prospective Cohort de validation	A2A3 (28%)	0.75 (0.69-0.81)
(Poynard, McHutchison et al. 2003)	352	Retrospective Avant le traitement	A2A3 (83%)	0.75 (0.69-0.81)
(Poynard, McHutchison et al. 2003)	352	Retrospective Après le traitement	A2A3 (39%)	0.86 (0.80-0.92)
(Halfon, Bourliere et al. 2006)	504	Prospective	A2A3 (39%)	0.73 (0.69-0.77)
(Morali, Maor et al. 2007)	81	Prospective	-	0.79 (0.73-0.85)
(Fontanges, Bailly et al. 2008)	96	Prospective	-	0.64 (0.58-0.70)
(Anastasiou, Alisa et al. 2010)	48	Prospective	A1A2A3 (57%)	0.83 (0.75-0.91)
(Poynard, Munteanu et al. 2010)	1250	Prospective	A2A3 (36%)	0.74 (0.70-0.75)
(Poynard, Munteanu et al. 2010)	2017	Méta-analyse		0.77 (0.72-0.81)

III-5-3. SteatoTest, le NashTest et l'AshTest

Le SteatoTest (Poynard, Ratziu et al. 2005), le NashTest (Poynard, Ratziu et al. 2006) et l'AshTest (Thabut, Naveau et al. 2006) estiment de façon respective la stéatose du foie, la stéatohépatite métabolique ou stéatohépatite alcoolique. Ces biomarqueurs comprennent les mêmes paramètres que ceux du FibroTest-ActiTest combinés à l'aspartate aminotransférase (ASAT), la glycémie à jeun, le cholestérol total et les triglycérides ajustés pour l'âge, le sexe et l'IMC. Les tableaux 13-15 résument les seuils et les conversions par rapport à l'histologie de ces biomarqueurs

Tableau 13. Conversion entre les scores du SteatoTest et le degré de stéatose hépatocytaire estimé par la biopsie

SteatoTest	Dégré de stéatose estimé par l'SteatoTest	% de stéatose hépatocytaire
0.6901-1.0000	S3	>32%
0.6701-0.6900	S2-S3	6-32%
0.5701-0.6700	S2	6-32%
0.4801-0.5700	S1-S2	1-5%
0.3801-0.4800	S1	1-5%
0.3001-0.3800	S0-S1	< 1%
0.0000-0.3000	S0	< 1%

Tableau 14. Conversion entre les scores du NashTest et les catégories de stéatohépatite métabolique par le NAS score (Kleiner, Brunt et al. 2005)

NashTest	Grade de stéatohépatite métabolique
0.75	Stéatohépatite métabolique
0.50	Possible stéatohépatite métabolique
0.25	Pas de stéatohépatite métabolique

Tableau 15. Conversion entre les scores de l'AshTest et les catégories de stéatohépatite alcoolique chez les patients avec une maladie alcoolique du foie.

AshTest	Grade de stéatohépatite alcoolique
0.7801-1.0000	H3 (sévère)
0.5536-0.7800	H2 (importante)
0.1701-0.5535	H1 (modérée)
0.0000-0.1700	H0 (absente)

La performance diagnostique du SteatoTest a été validée chez 744 patients ayant une maladie chronique du foie et 140 volontaires sains ou donneurs de sang. Le groupe d'évaluation initial était composé de 310 patients. Trois groupes de validation étaient composés de patients ayant une hépatite chronique C naïfs de traitement (n=171), après

traitement antiviral (n=201) et des patients ayant une maladie alcoolique du foie (n=62). Le test a été performant pour diagnostiquer la présence d'une stéatose (>5%), AUROC de 0.80 (*standard error*=0.02) dans toute la population. Les AUROC ont varié de 0.72 à 0.86 dans les groupes évalués (Poynard, Ratziu et al. 2005). Le SteatoTest a été également validé pour le diagnostic d'une stéatohépatite chez 1909 patients à risque d'une NAFLD (Ratziau, Giral et al. 2007). Plus récemment, la performance diagnostique du SteatoTest a été validé pour le diagnostic d'une stéatose avancée chez les obèses morbides avec une wAUROC de 0.80 (95% IC 0.79-0.83) (Poynard, Lassailly et al. 2012).

La performance diagnostic du NashTest a été validée chez 257 patients ayant une NAFLD et un groupe contrôle composé de 383 volontaires sains ou donneurs de sang [AUROC=0.79 (95% IC 0.67-0.87) pour le diagnostic d'une NASH] (Poynard, Ratziu et al. 2006). L'AshTest a été validé pour le diagnostic d'une hépatite alcoolique chez 225 patients ayant une maladie alcoolique du foie et 229 donneurs de sang. L'AUROC variait entre 0.88 et 0.90 pour le diagnostic d'une hépatite alcoolique modéré ou sévère (Thabut, Naveau et al. 2006).

III-6. La valeur pronostique du FibroTest dans les maladies chroniques du foie

La valeur pronostique du FibroTest pour prédire la mortalité globale et les complications associées à la maladie hépatique a été validée dans les hépatites chroniques virales et dans la maladie alcoolique du foie.

La première étude de l'équipe ayant évalué la valeur pronostic du FibroTest chez 537 patients infectés par le VHC a démontré que ceux qui avaient une maladie du foie associée à une fibrose sévère (FibroTest > 0.58) avaient une survie globale à 5 ans ainsi qu'une survie sans complications ou décès de cause hépatique à 5 ans inférieure à ceux qui avaient une

fibrose minime (FibroTest < 0.32) ou modérée ($0.32 \leq \text{FibroTest} \leq 0.58$) (Ngo, Munteanu et al. 2006). Le taux de survie globale a été 90.5% (95% IC 85.3–95.7) chez les patients avec une fibrose sévère par rapport à 98.9% (97.3–1.00) chez ceux ayant une fibrose minime. La survie globale chez les patients ayant une fibrose sévère était inférieure à une population contrôle française appariée par l'âge et le sexe [90.5% (85.3–95.7) versus 95.1% (92.3–96.0), $p < 0.001$]. La survie sans décès d'origine hépatique était également inférieure chez les patients ayant une fibrose sévère par rapport à ceux qui avaient une fibrose minime [92.7% (88.0–97.3) versus 100%; $p < 0.001$]. Des résultats similaires ont été démontrés pour la survie à 5 ans sans complication hépatique [78.5% (71.2–85.9) pour les patients ayant une fibrose sévère versus 100% pour ceux qui avaient une fibrose minime, $p < 0.001$].

Une étude d'une équipe indépendante a permis de montrer que même à l'intérieur de la cirrhose (FibroTest > 0.75), ce biomarqueur était prédictif de la mortalité globale à 5 ans chez 1457 patients infectés par le VHC. La survie globale à 5 ans par rapport à l'estimation de la fibrose par le FibroTest était de 97% (95% IC 96-98) pour les non cirrhotiques (FibroTest ≤ 0.75), 87% (78-95) pour $0.75 < \text{FibroTest} \leq 0.80$, 69% (54-84) pour $0.90 < \text{FibroTest} \leq 0.95$ et 0% (0-22) pour FibroTest > 0.95 (Vergniol, Foucher et al. 2011).

Le FibroTest est également prédictif de la mortalité globale et de la survenue de complications hépatiques à 5 ans dans l'hépatite chronique B (Ngo, Benhamou et al. 2008). La survie à 5 ans sans complications hépatiques était supérieure chez les patients ayant une fibrose minime [99%(95% IC 98-100)] par rapport à ceux ayant une fibrose modérée [94% (89% 71-99)] ou sévère [78% (71-84)] ($p < 0.001$). Le FibroTest était également prédictif de la mortalité hépatique et globale à 5 ans dans cette population. Le taux de survie globale à 5 ans a été de 99.4% (98.4–100) chez les patients avec une fibrose minime versus 80.5% (73.8–87.1) chez ceux qui avaient une fibrose sévère ($p < 0.001$). La survie sans mortalité d'origine hépatique était aussi supérieure chez ceux qui avaient une fibrose minime par rapport aux

patients ayant une fibrose sévère [99.4% (98.4–100) versus 84.2% (77.9–90.5), $p < 0.001$]. Plus récemment, une étude d'une équipe indépendante a validé la valeur pronostique du FibroTest pour prédire la mortalité globale chez les patients infectés par le virus de l'hépatite B (de Ledinghen, Vergniol et al. 2013). Dans cette étude, l'estimation de la fibrose par le FibroTest est restée significative pour la prédiction de la mortalité globale dans un modèle multivarié ajusté pour les facteurs confondants.

Des résultats similaires pour la prédiction à 10 ans des événements graves par le FibroTest ont été rapportés chez les patients ayant une maladie alcoolique du foie (Naveau, Gaude et al. 2009). Le taux de survie globale était inférieur chez les patients ayant une fibrose sévère par rapport à ceux qui avaient une fibrose minime [42.4% (31.1-53.6) versus 71.4% (60.7-82.2), $p < 0.0001$]. La survie sans décès hépatiques était également inférieure chez les patients avec une fibrose sévère par comparaison avec les patients ayant une fibrose minime [62.6% (52.2-73.1) versus 92.0% (84.9-99.0), $p < 0.0001$]. La présence d'une fibrose sévère ou d'une cirrhose estimée par le FibroTest est restée comme un facteur prédictif de la mortalité globale indépendamment des facteurs confondants.

Une méta-analyse, réalisée par l'équipe, a validé la valeur pronostique du FibroTest pour prédire les complications associées à la maladie du foie et la mortalité globale chez les patients ayant une maladie chronique du foie. La performance pronostique du FibroTest était meilleure que celle d'autres biomarqueurs et au moins aussi bonne que celle de la biopsie hépatique pour prédire la mortalité globale (Poynard, Ngo et al. 2011). Plus récemment, une autre étude de l'équipe a démontré la valeur du FibroTest pour prédire l'incidence des varices œsophagiennes et les complications sévères associées à la maladie du foie chez 3,927 patients infectés par le VHC (Poynard, Vergniol et al. 2013).

Chapitre IV - Limites des marqueurs non-invasifs

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

IV-1. Applicabilité

L'applicabilité est une limitation majeure de l'élastographie transitoire. Cette méthode est considérée non interprétable ("*unreliable*") en l'absence d'au moins un des trois critères suivantes: (i) 10 mesures valides, (ii) le ratio IQR/médiane $< 30\%$ et (iii) le taux de réussite $> 60\%$. L'élastographie transitoire est considérée comme non applicable en cas d'échec ("*failure*"), l'absence totale de mesures valides (de Ledinghen and Vergniol 2008). La mesure de l'élasticité du foie par la sonde M considérée comme non-applicable chez environ 20% des patients (15% d'examens non interprétables et 5% d'échec de mesure), souvent atteints de maladie métabolique (Foucher, Castera et al. 2006; Castera, Forns et al. 2008). L'inexpérience de l'opérateur et le fait d'avoir une obésité ($\text{IMC} > 30\text{Kg/m}^2$), 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 transitoire 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 transitoire ont été rapportés chez les patients diabétiques de type 2 (de Ledinghen, Vergniol et al. 2012). L'association entre le non applicabilité de ce marqueur non invasif et la présence de facteurs métaboliques entraîne un problème majeur pour l'utilisation de l'élastographie transitoire chez les patients ayant une NAFLD.

Le taux de non applicabilité de cette méthode a été diminué surtout chez les patients obèses par le développement de la sonde XL (de Ledinghen, Vergniol et al. 2010; de

Ledinghen, Wong et al. 2012; Myers, Pomier-Layrargues et al. 2012; Wong, Vergniol et al. 2012). 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 transitoire peut être améliorée par l'utilisation de la sonde XL. Pourtant, l'estimation de la stéatose par la mesure du CAP continue d'être fortement limitée par son applicabilité car cette méthode est disponible uniquement avec la sonde M du Fibroscan. Les critères d'applicabilité de la CAP sont les mêmes que ceux de l'élastographie transitoire. La mesure du CAP peut être non applicable chez 30% des patients ayant une NAFLD (Myers, Pollett et al. 2012).

Par comparaison, le panel des biomarqueurs du FibroMax (FibroTest, ActiTest, SteatoTest, NashTest et AshTest) a été 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 biomarqueur est considéré comme non interprétable en présence d'une valeur extrême d'un paramètre, en dehors du percentil entre 1% et 99%, qui entraînent une variation d'au moins 0.30 unité du biomarqueur, soit 1.5 stades. Les causes rares de non applicabilité de cette méthode sont les hépatites aiguës et les hémolyses surtout associés à la présence d'une valve cardiaque métallique (Poynard, Munteanu et al. 2011).

IV-2. Variabilité

La reproductibilité d'un examen est aussi importante que son applicabilité dans la pratique clinique. Les premières études sur la reproductibilité de l'élastographie transitoire ont rapporté des résultats encourageants. Le taux de variabilité inter et intra observateur de l'élastographie transitoire 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 opérateurs 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 ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$) 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 transitoire réalisée par 4 opérateurs chez 46 patients (Boursier, Konate et al. 2008). En revanche, cette dernière étude a démontré une discordance d'au moins un stade de fibrose chez 25% des patients. Récemment, d'autres études ont contredit ces résultats en rapportant une reproductibilité de l'élastographie transitoire plus modeste (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. 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).

Concernant les biomarqueurs, 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 par 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 souvent pas disponible pour la plupart des laboratoires. Afin de réduire le risque de variabilité inter-laboratoire, les biomarqueurs 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).

Les paramètres utilisés dans la formule du FibroMax sont exprimés en valeur absolue et la variabilité inter-laboratoire a été faible dans une étude qui a comparé le laboratoire de référence à 8 autres laboratoires français (Halfon, Imbert-Bismut et al. 2002). Les paramètres du FibroTest-ActiTest n'ont pas eu une variabilité intra-individuelle significative dans une analyse répétée après 4 jours sur le même échantillon (Imbert-Bismut, Messous et al. 2004).

IV-3. Facteurs influençant l'estimation de la fibrose

Plusieurs facteurs confondants peuvent influencer l'estimation de la fibrose hépatique par des méthodes non-invasives. La fibrose du foie peut être surestimée par l'élastographie transitoire en présence d'une activité nécrotico-inflammatoire, représentée par l'augmentation des transaminases (Arena, Vizzutti et al. 2008; Sagir, Erhardt et al. 2008). Une étude a montré que la valeur médiane de l'élastographie transitoire 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'élastographie transitoire avant et trois mois après le début d'un traitement à cause d'une répllication 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 regression de la fibrose. Des résultats similaires ont été décrits dans l'hépatite chronique C. La mesure de l'élastographie transitoire 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.

L'estimation de la fibrose par l'élastographie transitoire peut être également surestimée en présence d'une cholestase extra-hépatique et d'une congestion vasculaire hépatique. 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'optimization du traitement de patients qui avaient une insuffisance cardiaque décompensée à l'inclusion (Colli, Pozzoni et al. 2010).

Selon quelques études la stéatose pourrait influencer l'estimation de la fibrose hépatique par l'élastographie transitoire. 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). Une étude de l'équipe a démontré que l'élasticité du foie était plus élevée chez les patients qui avaient une stéatose hépatique, d'après le SteatoTest, par rapport à ceux qui n'avaient pas de stéatose. La présence d'une NAFLD a été un facteur indépendamment associé à la discordance entre le FibroTest et l'élastographie transitoire (Poynard, Ingiliz et al. 2008). Le rationnel scientifique de la surestimation de la fibrose par l'élastographie serait l'augmentation de l'élasticité du foie par l'infiltration graisseuse.

IV-4. Objectifs du travail

Plusieurs marqueurs non invasifs ont été développés pour l'estimation de la fibrose du foie. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte pour une évaluation correcte de la performance et l'utilisation d'un marqueur non invasif de fibrose. D'abord la biopsie hépatique, souvent utilisée comme référence dans les études, n'est pas une méthode parfaite. En plus d'être une méthode invasive et coûteuse, l'erreur d'échantillonnage et la variabilité inter-observateur sont les principales limites de la biopsie hépatique (Bedossa, Dargere et al. 2003; Colloredo, Guido et al. 2003). Les limites de méthodes doivent être considérées dans l'interprétation et l'utilisation d'un marqueur non invasif dans la pratique clinique. Des études sur la variabilité inter-observateur de l'élastographie transitoire ont rapporté des résultats contradictoires sur la reproductibilité de cette méthode. L'activité nécrotico-inflammatoire, la

cholestase extra-hépatique et la congestion vasculaire du foie peuvent influencer l'élastographie transitoire en provoquant des faux positifs. L'hémolyse, l'hyperbilirubinémie ou l'inflammation systémique sont les facteurs influençant l'estimation de la fibrose du foie par le FibroTest. Enfin, les biomarqueurs qui utilisent les transaminases dans ses formules peuvent surestimer la fibrose à cause de l'activité nécrotico-inflammatoire hépatique.

L'objectif principal de cette partie du travail était d'évaluer les limites des marqueurs non invasifs pour l'évaluation de la fibrose hépatique. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé l'hépatite chronique virale C comme modèle de maladie chronique du foie dans les deux premières études. Premièrement, nous avons réalisé une étude pour évaluer la variabilité inter-observateur de l'élastographie transitoire entre deux opérateurs expérimentés, chez des patients infectés par le VHC. Nous avons également évalué la variabilité de l'APRI et l'impact de l'activité nécrotico-inflammatoire sur ce biomarqueur qui utilise l'aspartate transaminase exprimée en multiple de la normale pour estimer la fibrose hépatique, chez des patients ayant une hépatite chronique virale C. Deuxièmement, nous avons réalisé une étude pour évaluer l'influence de la stéatose sur l'estimation de la fibrose du foie par l'élastographie transitoire chez les sujets à haut risque d'une NAFLD, ayant un diabète de type 2.

IV-5. Article 1: "Interobserver Variability in Transient Elastography Analysis of Patients with Chronic Hepatitis C"

Title page

Interobserver Variability in Transient Elastography Analysis of Patients with Chronic Hepatitis C

Short title: The variability of transient elastography

Author Names:

Hugo Perazzo ^{1,2}, Flavia F Fernandes ³, Amanda Gomes ³, Carlos Terra ³, Renata M Perez ^{3,4},
Fátima A F Figueiredo ³

Department/Institution Names:

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpêtrière, Hepatology Department,
Paris, France

² INSERM UMR_S 938 & Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

³ University of the State of Rio de Janeiro, Liver Unit, Gastroenterology and Hepatology
Department, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ D'Or Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author:

Hugo Perazzo

47-83, Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

E-mail: perazzohugo@gmail.com

Tel: +33 1 42 16 10 27

Fax +33 1 42 16 10 12

Author Contributions: Hugo Perazzo: study concept and design, performance of exams, statistical analysis, interpretation of data, manuscript drafting and critical revision; Flavia F Fernandes: performance of exams, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript; Amanda Gomes: administrative and technical support; Carlos Terra: study concept and design, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript; Renata M Perez: study concept and design, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript; Fátima A F Figueiredo: study concept and design, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript, study supervision. All authors approved the final version of the manuscript.

Disclosures: The authors have no conflict of interest to disclose.

Financial support: This work was supported by funding from the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; CI, confidence interval; FLI, fatty liver index; GGT, gamma-glutamyltransferase; HCV, hepatitis C virus; HDL, high density lipoprotein; HIV, human immunodeficiency virus; ICC, intraclass correlation coefficient; IQR, interquartile range; kPa, kilopascals; RNA, ribonucleic acid

Word count

Abstract: 252; Manuscript: 2821; References: 33; Tables: 4; Figures: 2; Supplementary File: 4 tables

Abstract

Background: Transient elastography based on liver stiffness measurement is a non-invasive method to assess hepatic fibrosis. However, interobserver variability has led to controversy over its use in fibrosis evaluation.

Aims: To evaluate the interobserver variation in transient elastography in chronic hepatitis C.

Methods: We performed a cross-sectional study, analyzing findings from 2 experienced operators who each assessed 195 patients by transient elastography on the same day. Liver stiffness measurement used to define fibrosis stages, based on METAVIR score, was: <7.1 as F0F1, 7.1–9.4 as F2, 9.5–12.4, as F3 and >12.4 kPa as F4. We also assessed interobserver variation in identification of potential esophageal varices screening based on transient elastography.

Results: The interobserver intraclass correlation coefficient was 0.940 (95%CI 0.863–0.967) and measurements made by operators correlated [Spearman's $\rho=0.924$; $P<0.001$]. However, the median liver stiffness measurement assessed by first operators was higher (11.5 vs 9.8 kPa; $P<0.001$). The discordance between operators was 35% for at least 1 stage of fibrosis and 5% for 2 or more stages. Interobserver reliability values were $\kappa=0.61$ for fibrosis stages $F\geq 2$ and $\kappa=0.80$ for cirrhosis. Among the 74 patients determined to have cirrhosis by at least 1 operator, there was considerable discordance in identification of those with indication for esophageal varices screening (κ values from 0.13 to 0.61) according to several cut-offs.

Conclusion: Although a high correlation of liver stiffness measurement between operators, interobserver variability of transient elastography was not negligible. This method should not be used as the only screening tool for esophageal varices in chronic hepatitis C.

Keywords: HCV; ultrasound; diagnostic; FibroScan

Introduction

Chronic hepatitis C, one of the main causes of chronic liver disease worldwide, presents a natural history extremely variable, from minimal changes to extensive fibrosis, cirrhosis and occasional development of hepatocellular carcinoma (1). The correct determination of liver fibrosis stage has important implications for prognostic, therapeutic and monitoring purposes (2). Liver biopsy has been historically used to stage hepatic fibrosis. However, this method has been challenged by limited feasibility, potential complications, sampling error and interobserver variability (3).

Several noninvasive markers to stage liver fibrosis have been proposed to replace liver biopsy (4, 5). Transient elastography by FibroScan (EchoSens, Paris, France) measures liver stiffness and is one of the most validated noninvasive markers of liver fibrosis (6). In addition this method has demonstrated a prognostic value for prediction of overall mortality and liver-related outcomes (7, 8). Briefly, a transducer probe transmits vibrations of mild amplitude and low frequency (50 Hz) inducing elastic shear waves that propagate through the liver tissue. Propagation of shear waves is followed using a pulse-echo ultrasound acquisition and its velocity is measured, that is directly correlated to liver stiffness: the stiffer is the tissue, faster the shear wave propagates. The examination is painless, fast (less than 5 minutes) and can be easily performed at bedside. The result of the test represents the median of all valid acquisitions and ranges from 2.5 to 75.0, expressed in kilopascals (kPa) (6). Feasibility/reliability and interobserver variability seems to be major issues of transient elastography. Few studies evaluated interobserver variability of transient elastography, most of them presenting conflicting results (9-12).

The primary aim of our study was to evaluate the interobserver variability of transient elastography in patients with chronic hepatitis C, obtained in the same day, by two experimented operators. The secondary aim was to evaluate the discordance rate for

indication of oesophageal varices screening based on transient elastography using several cut-offs points for portal hypertension prediction proposed in the literature.

Material and Methods

Study design

This cross-sectional study was conducted on the Liver Unit of the University of the State of Rio de Janeiro, Brazil. The inclusion criteria were: age older than 18 years and chronic infection by hepatitis C, characterized by the presence of HCV-RNA in blood serum. The exclusion criteria were the presence of ascites, pacemaker or pregnancy. Two-hundred and thirty consecutive patients with chronic hepatitis C were invited to participate. A positive response was obtained in 85% of patients. Therefore 195 pairs of exams were realized by two operators at the same day. Both operators have realized more than 500 exams previously, being classified as experienced operators (13). Laboratory blood analysis was realized in a maximal delay of 6 months before or after transient elastography. Fatty Liver Index (FLI) was used to estimate liver steatosis. This biomarker uses BMI, waist circumference, GGT and triglycerides and $FLI \geq 60$ was considered as presence of steatosis (14).

The study protocol was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, and was approved by the local Ethics Committee. All patients signed an informed consent upon enrollment in the study.

Transient Elastography

Transient elastography was performed with FibroScan (EchoSens, Paris, France), using the M probe, following a validated procedure (6, 15). Briefly, the patient was placed in dorsal decubitus with right arm in maximal abduction. The tip of the probe was placed perpendicularly on the skin in an intercostal space at the level of the right lobe of the liver,

usually where liver biopsy would be performed (i.e., intersection between the xyphoid line and the median axillary line). The operator, assisted by a time-motion ultrasound image, located a liver portion free of large vascular structures where measures would not be influenced by respiratory phases and acquired a measurement. Transient elastography was considered reliable when the following criteria had been met: (i) 10 successful measurements; (ii) an interquartile range lower than 30% of the median value; and (iii) a success rate of more than 60%.(16) Liver stiffness was considered as the median of all valid measurements. Non-applicable liver stiffness measurement was defined as either the presence of valid measurements that did not meet the above-described criteria (an unreliable test) or total absence of valid measurements (a failure test).

For each patient, examinations were performed, at the same day (one test just after the other), by two operators who were blinded to clinical and histological data. Examinations were systematically performed by observer one followed by observer two. Operators were blinded to liver stiffness measurement performed by his colleague and they were instructed to not give any result to patients during the protocol.

Liver fibrosis staging and indication for oesophageal varices screening

Liver fibrosis, estimated by transient elastography, was converted to the METAVIR scoring system (17) as proposed by Castera *et al* (15): <7.1 as F0F1; 7.1-9.4 as F2; 9.5-12.4 as F3 and >12.4 kPa as F4. These cut-offs were previously validated (16). Several cut-offs for prediction of portal hypertension based on the presence of oesophageal varices, published in the last years ranging from 13.9 to 25.0 kPa, were analyzed (18-23). Liver stiffness measurement higher than the proposed cut-off defined the potential indication for oesophageal varices screening.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using STATA statistical package for Windows (2012; StataCorp LP, College Station, TX, USA). Continuous variables were reported as median (range). Discrete variables were reported as absolute and relative frequency. Non-parametric tests, Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative comparisons, were used. Applicable examinations obtained by both operators were compared and assessed by Wilcoxon signed-rank for paired continuous variables, McNemar for paired discrete variables and Spearman's rank correlation. Interobserver agreement was assessed using the intraclass correlation coefficient (ICC) and Kappa (κ) index. In addition, the Bland-Altman graphic was plotted.(24) Significance level was determined when $P \leq 0.05$ assuming two-tailed tests.

Results

Transient elastography was performed by both operators in 195 patients [34% male gender, median age 58 (21-77) years, BMI 26.3 (17.3-46.6) Kg/m² and waist circumference 94 (68-127) cm)]. Among the 195 pairs of tests (total of 390 examinations) there was no statistical difference in the feasibility between the two operators. Applicability rate was the same for both operators: 88.2%. Unreliable test was observed in 5.1% vs 4.1% and failure in 6.7% vs 7.7% of our sample (first vs second operator ; $P = 0.75$). Transient elastography was considered as reliable by both operators in 165 (84.6%) patients. The median delay between examinations was 30 (3-219) minutes. Table 1 summarizes patient's characteristics.

The overall interobserver agreement ICC was 0.940 (95%CI 0.863-0.967). In addition, the correlation between first and second operator was excellent (Spearman's value $\rho=0.924$, $P < 0.001$). Figure 1 graphically displays the relationship between the results of both tests. However, we observed an important difference of the median values of liver stiffness

measurements between examinations performed by the first and second operator in the paired patients (11.5 vs 9.8 kPa for the 2nd operator; $P < 0.001$) (Table 2).

Moreover, a not negligible discordance of fibrosis staging between operators was observed by this method. Discordance of at least one stage and for two or more stages of fibrosis was 35% and 5%, respectively (Table 3). Supplementary Table S1 summarizes the factors associated with discordance on fibrosis stage based on liver stiffness measurement. Interobserver reliability values were $\kappa=0.51$, $\kappa=0.61$, $\kappa=0.72$ and $\kappa=0.80$ for any grade of fibrosis, for fibrosis stages $F \geq 2$, for fibrosis stages $F \geq 3$ and for cirrhosis, respectively. Bland-Altman plot showed an acceptable agreement, presenting only 7 patients scoring outside the tramlines (95 per cent limits of agreement of ± 2 standard deviation) (Figure 2). However, this graphic highlighted a trend of difference across the mean rates with a greater disagreement in higher liver stiffness.

Analyzing 74 patients classified as cirrhosis at least by one operator [median age 61 (30-77) years, ALT 81 (18-307) U/L, platelets counts 143 (57-345) $\times 10^9/L$], data showed an important discordance between operators regarding the indication of esophageal varices screening based on transient elastography. The κ values for agreement on the indication of oesophageal varices screening was poor to moderate, ranging from 0.13 to 0.61 according to the evaluated cut-off (Table 4).

Discussion

In the last years, few papers were published referring the variability of transient elastography, most of them presenting conflicting results (9-12). Although this study has shown an excellent correlation between the two operators, we should highlight a considerable interobserver variability of transient elastography.

The excellent correlation between operators [ICC 0.94 (95%CI 0.863-0.967); $P < 0.001$ and Spearman's $\rho=0.924$; $P < 0.001$] described in our study confirmed the results of previous

publications (9, 10, 12). Furthermore, the κ values for diagnosis of fibrosis stages $F \geq 2$ (0.61) and cirrhosis (0.80) showed in our results, were very similar to those described by others authors (11).

Fraquelli *et al* (9), the first authors that evaluated the reproducibility of transient elastography, reported exciting results of an excellent interobserver ICC of 0.98 (0.977-0.987) in 200 patients with chronic liver disease, most of them with chronic hepatitis C infection. Although description of similar results, Boursier *et al* (10) also showed 25% of discordance of at least one stage of fibrosis. This relative high discrepancy of fibrosis stage was also reported by Roca *et al* (12) in a more recent publication (23%). We found higher rates of discordance than those described by these previous authors (10, 12). Transient elastography might be influenced by the etiology of liver disease (25) and the prevalence of fibrosis, known as spectrum effect (26). These two major factors may explain this difference among these studies. Our study included exclusively mono-infected chronic hepatitis C patients most of them with significant fibrosis. Conversely, Fraquelli *et al* (9) and Boursier *et al* (10) included patients with chronic liver disease of mixed etiologies and Roca *et al* (12) enrolled HIV patients, most of them (61%) with hepatitis C co-infection and mild liver fibrosis.

It is very difficult, even using liver biopsy, to well discriminate adjacent stages of fibrosis, especially intermediate stages (27). These high rates of discrepancy of at least one stage of fibrosis are not negligible and might influence the management of patients with chronic hepatitis C. Distinction between mild and fibrosis $F \geq 2$ indicates antiviral treatment in many countries such as Brazil. In this present study 27 (16.4%) patients were classified as mild fibrosis by one operator and $F \geq 2$ by the other. Furthermore the diagnosis of cirrhosis defines the start of hepatocellular carcinoma screening. We reported discordance in 16 (9.7%) patients on the cirrhosis diagnosis between operators impacting in the hepatocellular

screening. Thus, at least 25% of our patients would have had impact in their management by this discordance when using exclusively transient elastography.

Liver stiffness measurement by transient elastography is an accurate non-invasive marker for cirrhosis diagnosis (28). Several published papers have been describing its role on diagnosis of portal hypertension based on measurement of hepatic venous pressure gradient or presence of esophageal varices (18-23). However there is no consensus about the best cut-off point for prediction of oesophageal varices. Furthermore no study evaluated the interobserver variability for indication of varices screening based on liver stiffness measurements in paired patients. Thus, the secondary aim of this study was to assess the impact of observer variability on a potential screening of oesophageal varices by gastrointestinal endoscopy based on previously published cut-offs. Among six cut-offs proposed in the last decade, we showed high rates of discrepancy for indication of screening of oesophageal varices based on liver stiffness measurement (18-23). Furthermore, our study reported that the κ values for this purpose were poor to moderate according to the cut-off point.

As we showed in our Bland-Altman plot, there was a trend of greater disagreement across the increasing mean rates of liver stiffness. The heterogeneous distribution of liver fibrosis in chronic hepatitis C might explain this phenomenon. Thus in cirrhotic patients, especially those of one single test, liver stiffness measured by transient elastography must always be interpreted very carefully by specialist hands. Nowadays, the indication of oesophageal varices screening should be based on several factors and not only on liver stiffness measurement by transient elastography.

The variability of the transient elastography technique itself may impacts on the variability of results. The type of probe, choice of the intercostal space, patient's fasting status, angle of probe position and the respiratory phase when measure was acquired may also influence on liver stiffness measurement. Ingiliz *et al* reported a considerable variability on

liver stiffness according to probe position (29). In addition, liver stiffness measurement with the XL probe has been reported as lower than measurements using the M probe particularly in obese patients (30). The interobserver variability using XL probe has also to be assessed. In our study the examinations were performed exclusively with the M probe in a median delay of 30 minutes and in the same patient's fasting status. The probe should be placed perpendicularly on the reference point (i.e., intersection between the xyphoid line and the median axillary line). However, measurement spots were chosen by the respective operator during examination and the respiratory phase of each measure was not recorded.

One limitation of our study was the absence of liver biopsy, or validated blood tests to assess the impact of observer variability on the performance of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis or cirrhosis. Other limitations were the absence of assessment of the impact of hepatic necro-inflammatory activity or steatosis on liver stiffness measurement and the absence of evaluation of the intra-observer variability of this method.

A potential criticism would be the recruitment of patients that responded to a previous invitation, thus leading to a potential selection bias. Generally patients that respond to a hospital convocation might be those more attentive about their health care. However, our high response rate (85%) has probably reduced this potential bias. Effectively, our prevalence of advanced fibrosis and cirrhosis was higher than others series. It may be a reflex of the real population of our Liver Unit, in a country in development, where patients do not have an easily access to the health system. In the other hand, our high prevalence of advanced fibrosis and cirrhosis might improve transient elastography performance, because low staging grades of fibrosis were significantly associated with higher rates of disagreement between operators in previous analyses (9).

Our major strength was the fact that our sample was composed exclusively by patients with chronic hepatitis C infection. Previous studies that have evaluated transient elastography

interobserver variability analyzed patients with chronic liver disease of mixed etiologies. Liver stiffness measurement accuracy and proposed cut-offs were different according to the liver disorder (6). Probably, also there is a variation in the interobserver agreement of this method in different hepatic diseases. Thus this was the first study that evaluated this issue in a homogeneous chronic hepatitis C population. Furthermore, the evaluation of the interobserver variability for indication of oesophageal varices screening based on transient elastography was valorized by the high prevalence of advanced liver disease in our sample.

The interobserver variability might be due to interpretation of artificial transient elastography cut-offs. In our study, liver stiffness measurements were well correlated between operators. Among 74 patients diagnosed as cirrhosis (F4) by at least one operator only four were misclassified as significant fibrosis (F2) and none as mild fibrosis (F0F1). The major discrepancy was observed on F0 to F2 fibrosis stages, where published cut-offs are extremely variables. We used the classification system proposed by Castera *et al* (15) for chronic hepatitis C. However, we observed similar results on interobserver variability repeating the analysis using cut-offs proposed by Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9) (Supplementary Tables S2-S4). Thus, clinicians should be aware that the interobserver variability of transient elastography might exist and could impact on management of patients with chronic hepatitis C.

Non-invasive biomarkers can also accurately stage liver fibrosis in chronic hepatitis C (32). The low reliability rate and the interobserver variability are major weakness of transient elastography compared to blood tests. FibroTest (FibroSURE LabCorp Burlington, NC, USA) is the most validated biomarker for the non-invasive assessment of fibrosis stages in patients with chronic hepatitis C. The combination of FibroTest and transient elastography (Elasto-FibroTest) has significantly higher performances for cirrhosis diagnosis than FibroTest or transient elastography alone (33). The association of biomarkers with transient elastography

would minimize the limitations of transient elastography and could be useful in clinical practice.

The high variability of liver stiffness measurements in cirrhotic patients reinforce that transient elastography is not ready to replace gastrointestinal endoscopy for esophageal varices diagnosis. The indication of varices screening should not be based only on this method. Therefore, transient elastography results should be carefully analyzed by expert hands, especially in patients with a single evaluation due to the possibility of interobserver variability.

In conclusion, although liver stiffness measurement has had an excellent correlation between the two operators, transient elastography presented an interobserver variability that may not be negligible. This method should not be used as the only tool to stage fibrosis or screen of esophageal varices.

Figure legends:

Figure 1. Graphic representing the correlation between the two liver stiffness measurements

Figure 2. Bland and Altman plot. The solid line represents the mean of the difference of liver stiffness measurement (LSM) performed by both operators. The dashed lines define the limit of agreement (mean of $LSM \pm 2SD$)

References

1. Reggiardo MV, Fay F, Tanno M, *et al.* Natural history of hepatitis C virus infection in a cohort of asymptomatic post-transfused subjects. *Ann Hepatol* 2012; **11**: 658-66.
2. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; **55**: 245-64.

3. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; **38**: 1449-57.
4. Van Leeuwen DJ, Balabaud C, Crawford JM, *et al.* A clinical and histopathologic perspective on evolving noninvasive and invasive alternatives for liver biopsy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 491-6.
5. Poynard T, De Ledinghen V, Zarski JP, *et al.* Relative performances of FibroTest, Fibroscan, and biopsy for the assessment of the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a step toward the truth in the absence of a gold standard. *J Hepatol* 2012; **56**: 541-8.
6. De Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* 2008; **32**: 58-67.
7. 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**: 1970-9.
8. Singh S, Fujii LL, Murad MH, *et al.* Liver Stiffness Measurements are Associated with Risk of Decompensation, Liver Cancer, and Death in Patients with Chronic Liver Diseases: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013.InPress doi 10.1016
9. 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**: 968-73.
10. Boursier J, Konate A, Gorea G, *et al.* Reproducibility of liver stiffness measurement by ultrasonographic elastometry. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 1263-9.
11. 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**: 801-7.

12. Roca B, Resino E, Torres V, *et al.* Interobserver discrepancy in liver fibrosis using transient elastography. *J Viral Hepat* 2012; **19**: 711-5.
13. 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**: 828-35.
14. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, *et al.* The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; **6**: 33.
15. 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**: 343-50.
16. Poynard T, Ingiliz P, Elkrif 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.
17. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; **20**: 15-20.
18. 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**: 230-5.
19. Vizzutti F, Arena U, Romanelli RG, *et al.* Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis. *Hepatology* 2007; **45**: 1290-7.
20. 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.

21. Malik R, Lai M, Sadiq A, *et al.* Comparison of transient elastography, serum markers and clinical signs for the diagnosis of compensated cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25**: 1562-8.
22. Pritchett S, Cardenas A, Manning D, *et al.* The optimal cut-off for predicting large oesophageal varices using transient elastography is disease specific. *J Viral Hepat* 2011; **18**: e75-80.
23. Colecchia A, Montrone L, Scaioli E, *et al.* Measurement of spleen stiffness to evaluate portal hypertension and the presence of esophageal varices in patients with HCV-related cirrhosis. *Gastroenterology* 2012; **143**: 646-54.
24. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; **1**: 307-10.
25. Sebastiani G, Castera L, Halfon P, *et al.* The impact of liver disease aetiology and the stages of hepatic fibrosis on the performance of non-invasive fibrosis biomarkers: an international study of 2411 cases. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 1202-16.
26. Poynard T, De Ledinghen V, Zarski JP, *et al.* FibroTest and Fibroscan performances revisited in patients with chronic hepatitis C. Impact of the spectrum effect and the applicability rate. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; **35**: 720-30.
27. Poynard T, Lenaour G, Vaillant JC, *et al.* Liver Biopsy Analysis Has a Low Level of Performance for Diagnosis of Intermediate Stages of Fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; **10**: 657-63
28. Gara N, Zhao X, Kleiner DE, *et al.* Discordance among transient elastography, aspartate aminotransferase to platelet ratio index, and histologic assessments of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; **11**: 303-8.
29. Ingiliz P, Chhay KP, Munteanu M, *et al.* Applicability and variability of liver stiffness measurements according to probe position. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 3398-404.

30. De Ledinghen V, Wong VW, Vergniol J, *et al.* Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: comparison between M and XL probe of FibroScan(R). *J Hepatol* 2012; **56**: 833-9.
31. 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.
32. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann Intern Med* 2013; **158**: 807-20.
33. Poynard T, De Ledinghen V, Zarski JP, *et al.* Performances of Elasto-FibroTest((R)), a combination between FibroTest((R)) and liver stiffness measurements for assessing the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; **36**: 455-63.

Table 1. Baseline characteristics of the patients according to applicability of transient elastography

	All (n=195)	Applicable LSM by both operators (n=165)	Non-applicable LSM by at least one operator (n=30)	P value
Male gender	66 (34)	58 (35)	8 (27)	0.37
Age, years	58 (21-77)	57 (21-77)	61 (22-72)	0.12
Liver function tests				
ALT, U/L	62 (10-426)	66 (13-426)	32 (10-325)	0.001
AST, U/L	49 (19-577)	53 (19-577)	34 (21-405)	0.002
Transaminases > 2 x ULN	53 (36)	50 (39)	3 (15)	0.05
Alkaline Phosphatases, U/L	84 (25-523)	82 (25-523)	96 (45-285)	0.55
GGT, U/L	68 (10-999)	74 (12-999)	52 (10-280)	0.07
Metabolic factors				
BMI, kg/m ²	26.4 (17.3-46.6)	26.3 (17.3-46.6)	29.5 (18.7-41.1)	0.003
BMI ≥ 30 kg/m ²	48 (25)	34 (21)	14 (47)	0.005
Waist circumference, cm	94 (68-127)	93 (68-127)	101 (71-124)	< 0.001
Hip, cm	100 (77-138)	99 (77-138)	106 (87-124)	< 0.001
Central obesity	101 (52)	77 (47)	24 (80)	0.001
Fatty Liver Index (FLI)	59 (3-100)	58 (4-100)	64 (3-97)	0.44
Presence of liver steatosis, FLI > 60	69 (49)	58 (47)	11 (61)	0.26
Systolic blood pressure, mmHg	120 (80-150)	120 (80-150)	120 (100-120)	0.41
Diastolic blood pressure, mmHg	95 (60-115)	96 (60-115)	95 (60-103)	0.86
Fasting glucose, mg/dL	96 (64-289)	95 (64-289)	97 (74-167)	0.79
Triglycerides, mg/dL	95 (22-407)	94 (22-407)	115 (50-203)	0.13
Total cholesterol, mg/dL	168 (101-282)	167 (101-268)	183 (121-282)	0.13
HDL-cholesterol, mg/dL	47 (21-11)	46 (23-103)	46 (28-111)	0.80

Data expressed as median (range) or absolute (%). Comparisons were assessed by Mann-Whitney test

for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; FLI, Fatty Liver Index; GGT, gamma-glutamyltransferase; HDL, high density lipoprotein. Missing data (n): ALT (46); AST (46); AP (47); GGT (47); FLI (53); blood pressure (128); fasting glucose (48); triglycerides (52); total cholesterol (51); HDL-cholesterol (57)

Table 2. Characteristics of liver stiffness measurement performed by both operators

	First operator	Second operator	P value
Liver stiffness , kPa	11.5 (4.6 - 75)	9.8 (3.5 - 66.4)	< 0.001
Ratio IQR/LSM , %	17.1 (2.9 - 29.2)	16.7 (1.7 - 28.8)	0.35
100% sucess rate	86 (52.1)	81 (49.1)	0.87
Duration, seconds	100 (60 - 274)	91 (58 - 748)	0.91

Data expressed as median (range) or absolute (%). Comparisons were assessed by Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. IQR, interquartil range; kPa, kilopascals; LSM, liver stiffness measurement.

Table 3. Patient (n) staged for liver fibrosis by transient elastography performed by both operators based on the score system proposed by Castera *et al*¹⁵

First operator	Second operator				Total, n
	F0-F1	F2	F3	F4	
F0-F1	34	6	0	0	40
F2	17	5	2	1	25
F3	4	13	10	2	29
F4	0	3	10	58	71
Total, n	55	27	22	61	165

Table 4. Indication of oesophageal varices screening in 74 cirrhotic patients based on transient elastography according to several published cut-offs

Study	Cut-off (kPa)	First operator	Second operator	P value	κ values
Kazemi <i>et al</i> ¹⁸ (2006)	13.9	68 (91.8)	55 (74.3)	0.005	0.13
Vizzutti <i>et al</i> ¹⁹ (2007)	17.6	58 (78.3)	37 (50.0)	< 0.001	0.43
Castera <i>et al</i> ²⁰ (2009)	21.5	43 (58.1)	30 (40.5)	< 0.001	0.61
Mailk <i>et al</i> ²¹ (2010)	20.0	47 (63.5)	31 (41.9)	< 0.001	0.53
Pritchett <i>et al</i> ²² (2011)	19.5	49 (66.2)	32 (43.2)	< 0.001	0.51
Colecchia <i>et al</i> ²³ (2012)	25.0	33 (44.6)	25 (33.8)	0.06	0.61

Data expressed as absolute (%). Comparisons were assessed by the McNemar test for paired discrete variables. Castera *et al*¹⁶ cut-offs were used for fibrosis staging based on liver stiffness. κ,

Figure 1.

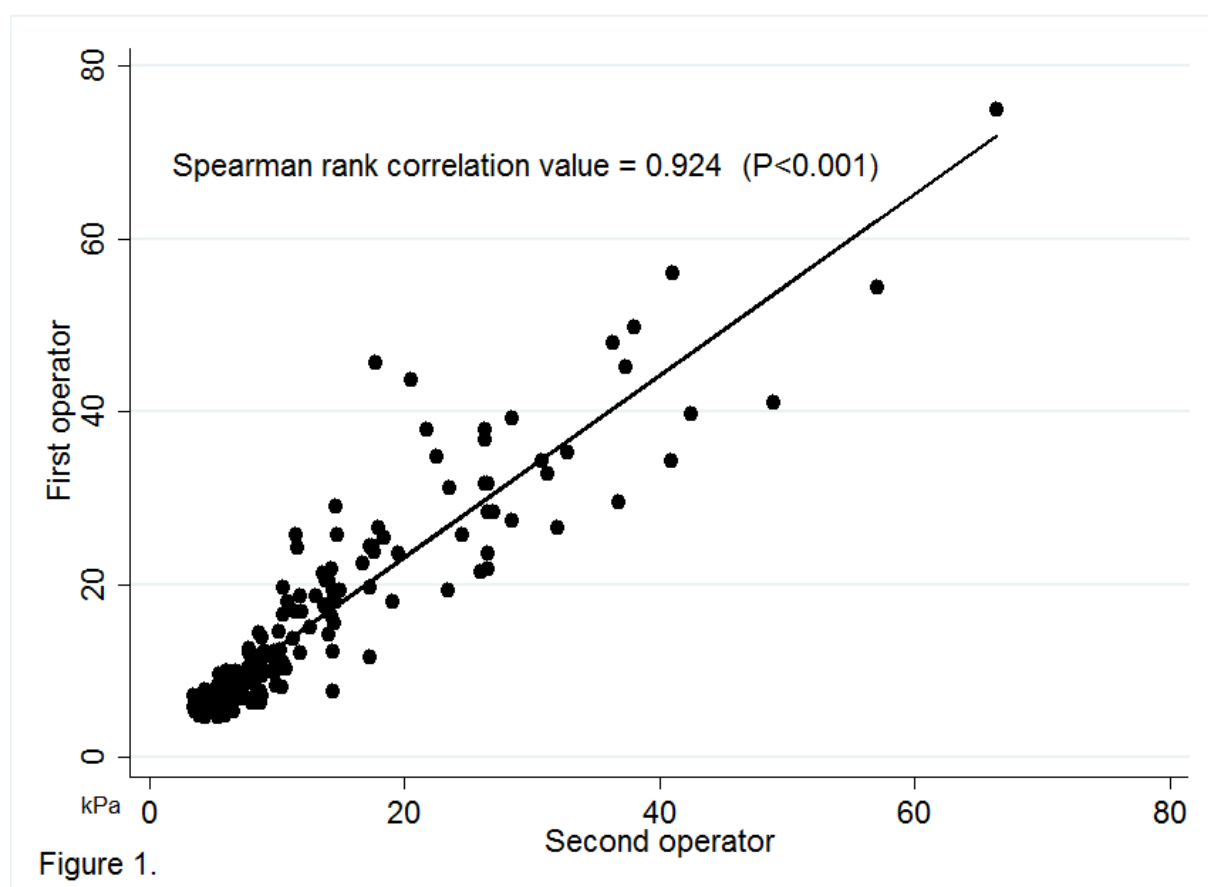
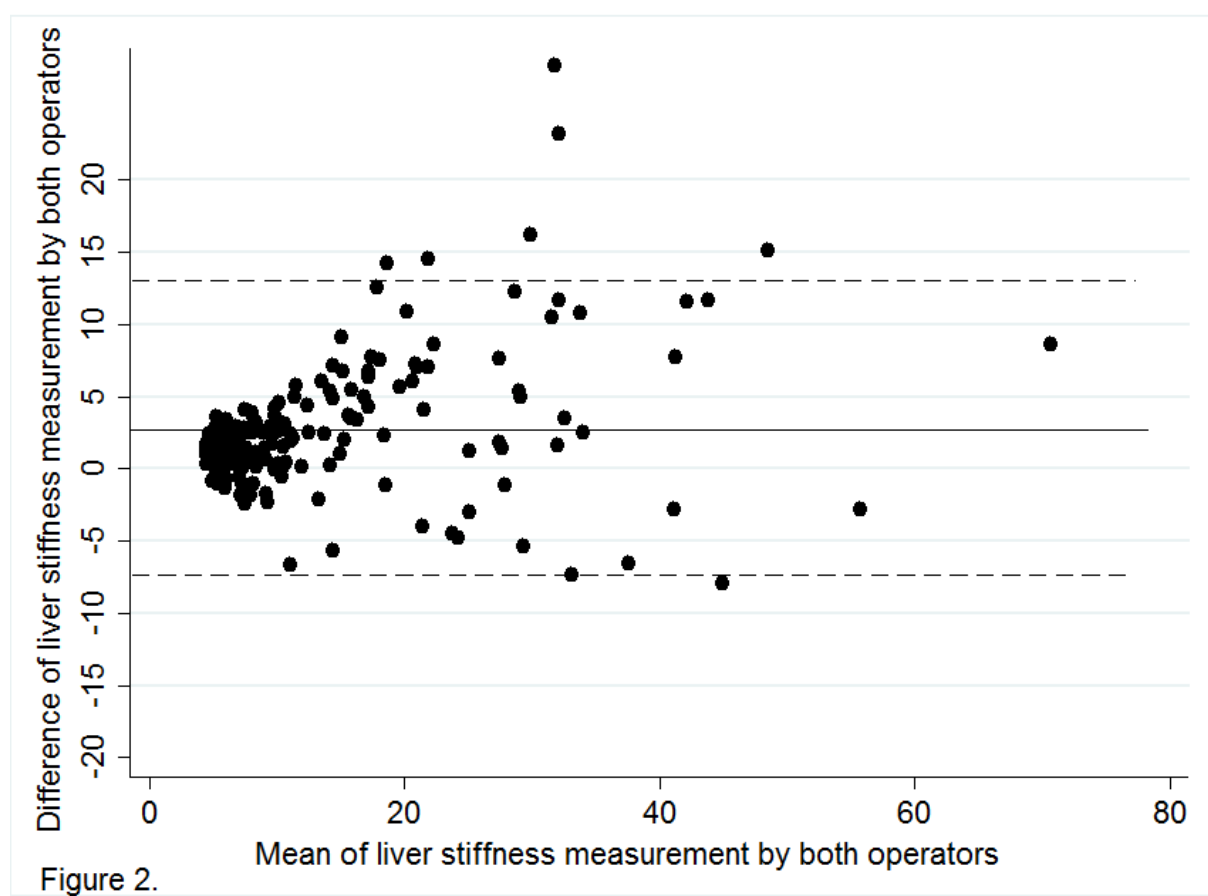


Figure 2.



Supplementary Tables

Supplement to: Interobserver Variability in Transient Elastography Analysis of Patients with Chronic Hepatitis C

Hugo Perazzo, Flavia F Fernandes, Amanda Gomes, Carlos Terra, Renata M Perez, Fátima A F Figueiredo

Supplementary Table S1. Risk factors associated with concordance/discordance on fibrosis staging based on liver stiffness measurement between the two operators.

Supplementary Table S2. Classification systems proposed by Castera *et al* (15), Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9) to assess liver fibrosis by transient elastography

Supplementary Table S3. Fibrosis staging by transient elastography performed by both operators using cut-offs proposed by Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9)

Supplementary Table S4: Interobserver agreement between two operators on staging liver fibrosis using cut-offs proposed by Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9)

Supplementary Table S1. Risk factors associated with concordance/discordance on fibrosis staging based on liver stiffness measurement between the two operators.

	Concordance of fibrosis stage (n=107)	Discordance of at least one fibrosis stage (n=58)	P value
Male gender	37 (35)	21 (36)	0.04
Age, years	57 (25-77)	57 (21-73)	0.71
Liver function tests			
ALT, U/L	71 (13-426)	61 (16-164)	0.29
AST, U/L	57 (19-577)	46 (20-131)	0.03
Alkaline Phosphatases, U/L	87 (25-523)	76 (28-157)	0.07
GGT, U/L	87 (12-999)	46 (15-213)	< 0.001
Metabolic factors			
BMI, kg/m ²	26.3 (19.6-46.6)	25.8 (17.3-35.2)	0.23
BMI ≥ 30 kg/m ²	24 (22)	10 (17)	0.43
Waist circumference, cm	94 (70-125)	91 (68-127)	0.17
Hip, cm	99 (77-138)	99 (80-115)	0.26
Central obesity	51 (48)	26 (45)	0.73
Presence of liver steatosis, FLI > 60	41 (50)	17 (41)	0.31
Systolic blood pressure, mmHg	120 (100-150)	120 (80-140)	0.15
Diastolic blood pressure, mmHg	95 (60-115)	97 (69-114)	0.58
Fasting glucose, mg/dL	93 (64-289)	97 (67-208)	0.28
Triglycerides, mg/dL	94 (47-407)	91 (22-160)	0.55
Total cholesterol, mg/dL	165 (101-268)	171 (104-221)	0.87
HDL-cholesterol, mg/dL	49 (21-95)	45 (23-103)	0.45

Data expressed as median (range) or absolute (%). Castera et al ¹⁶ cut-offs were used for fibrosis staging based on liver stiffness. Comparisons were assessed by Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; FLI, Fatty Liver Index; GGT, gamma- glutamyltransferase; HDL, high density lipoprotein. Missing data (n): ALT (46); AST (46); AP (47); GGT (47); FLI (53); blood pressure (128); fasting glucose (48); triglycerides (52); total cholesterol (51); HDL-cholesterol (57)

Supplementary Table S2. Classification systems proposed by Castera *et al* (15), Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9) to assess liver fibrosis by transient elastography

	Transient elastography cut-offs, kPa		
	<i>Castera et al</i> (15)	<i>Ziol et al</i> (31)	<i>Fraquelli et al</i> (9)
Fibrosis stages, METAVIR score ¹⁷			
F0-F1	< 7.1	< 8.5	< 7.9
F2	7.1 - 9.4	8.5 - 9.4	7.9 - 10.3
F3	9.5 - 12.4	9.5 - 14.4	10.4 - 11.9
F4	> 12.4	> 14.4	> 11.9

Supplementary Table S3. Fibrosis staging by transient elastography performed by both operators using cut-offs proposed by Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9)

-	<u>Second operator</u>				
First operator	F0-F1	F2	F3	F4	Total
Cut-offs proposed by <i>Ziol et al (31)</i>					
F0-F1	54	4	3	0	61
F2	4	0	0	0	4
F3	12	8	13	1	34
F4	0	0	20	46	66
Total	70	12	36	47	165
Cut-offs proposed by <i>Fraquelli et al (9)</i>					
F0-F1	45	5	0	1	51
F2	15	8	1	0	24
F3	0	9	2	1	12
F4	1	8	9	60	78
Total	61	30	12	62	165

Supplementary Table S4: Interobserver agreement between two operators on staging liver fibrosis using cut-offs proposed by Ziol *et al* (31) and Fraquelli *et al* (9)

	Cut-offs proposed by <i>Ziol et al</i> (31)	Cut-offs proposed by <i>Fraquelli et al</i> (9)
Discrepance between operators		
Discordance of at least one stage, n (%)	52 (32)	50 (30)
Discordance of two or more stages, n (%)	15 (9)	10 (6)
Patients classified as F4 by one operator and F $\leq$ 2 by the other, n (%)	0 (0)	10 (6)
Agreement between operators; κ values for		
Diagnosis of fibrosis stages F $\geq$ 2	0.71	0.70
Diagnosis of fibrosis stages F $\geq$ 3	0.72	0.76
Diagnosis of cirrhosis (F=4)	0.72	0.76

Data expressed as absolute (%). Interobserver reliability was asses

IV-5-2. Discussion de l'article 1

L'élastographie transitoire est une des méthodes non invasives les plus utilisées au monde. Cette méthode a une bonne performance diagnostique et peut être utilisée pour prédire la mortalité globale et d'origine hépatique. Les études sur la variabilité inter-observateur de l'élastographie transitoire sont discordantes. La première étude a décrit une bonne reproductibilité avec un coefficient de corrélation intra-classe de 0.98 (95% IC 0.977- 0.987) chez 200 patients qui avaient une maladie chronique du foie, la plupart infectés par le VHC (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007). Malgré une discordance d'au moins un stade de fibrose entre les examens réalisés par deux opérateurs expérimentés chez 25% des patients, d'autres auteurs ont rapporté un coefficient de corrélation intra classe similaire (Boursier, Konate et al. 2008). Un taux de discordance similaire entre les opérateurs pour la classification des patients a été rapporté dans une autre étude qui a évalué des patients infectés par le VIH (Roca, Resino et al. 2012).

Notre étude a démontré une concordance générale entre les opérateurs similaire aux publications précédentes avec un coefficient de corrélation intra-classe de 0.94 (95%CI 0.863-0.967) et une valeur de kappa (k) de 0.61 et de 0.80 pour le diagnostic d'une fibrose $F \geq 2$ et de cirrhose, respectivement. Cependant, nous avons rapporté un taux de discordance d'au moins un stade de fibrose plus élevé que ceux rapportés précédemment. Le diagnostic d'une fibrose significative ($F \geq 2$ de METAVIR) est prise en compte pour l'indication d'un traitement antiviral, tandis que le diagnostic de cirrhose entraîne le dépistage systématique de varices oesophagiennes et de carcinome hépatocellulaire dans l'hépatite chronique virale (EASL 2010). Dans notre étude, 16% de patients ont été classé comme F0F1 par un opérateur et comme $F \geq 2$ par l'autre opérateur. De plus, 10% de nos patients ont été considérés comme cirrhotique par un seul des deux opérateurs. Selon ces résultats, au moins 25% des patients

auraient une prise en charge clinique différente en fonction de l'opérateur si l'élastographie était utilisée comme seul estimateur de fibrose du foie.

Les résultats contradictoires pourraient être expliqués par l'impact sur l'élastographie transitoire de la prévalence de la fibrose et de la cause de la maladie du foie des patients inclus dans les différentes études. Notre étude a évalué des patients infectés par le VHC, ayant la plupart une fibrose hépatique significative. En revanche, les études de Fraquelli *et al* et de Boursier *et al* ont inclus des patients qui avaient une maladie du foie de diverses causes. En plus l'étude de Roca *et al* a inclus des patients infectés par le VIH, 60% co-infectés par le VHC, mais la plupart ayant une fibrose minime.

La mesure de l'élasticité du foie par l'élastographie transitoire est très performante pour le diagnostic d'une cirrhose (Gara, Zhao *et al.* 2013). Plusieurs auteurs ont décrit le rôle de cette méthode non-invasive pour le diagnostic de l'hypertension portale basé sur le gradient de pression veineuse hépatique ou la présence de varices oesophagiennes (Kazemi, Kettaneh *et al.* 2006; Vizzutti, Arena *et al.* 2007; Castera, Le Bail *et al.* 2009; Malik, Lai *et al.* 2010; Pritchett, Cardenas *et al.* 2011; Colecchia, Montrone *et al.* 2012). Cependant, il n'y a pas encore de seuil bien défini pour prédire l'hypertension portale par cette méthode. Notre objectif secondaire a été de comparer la variabilité inter observateur pour l'indication d'un dépistage de varices oesophagiennes basé sur l'élastographie transitoire en utilisant plusieurs seuils préalablement publiés. Notre étude a démontré des taux élevés de discordance entre les opérateurs pour l'indication d'un dépistage de varices oesophagiennes en utilisant six seuils différents. Nous avons également rapporté des valeurs de concordance κ faibles qui ont varié de 0.13 à 0.61 pour cette proposition.

La variabilité de l'élastographie transitoire peut être due à la réalisation technique de la méthode. Le type de sonde utilisé, la phase respiratoire et la position de la sonde pendant

l'acquisition des mesures ainsi que le statut alimentaire du patient influencent l'élastographie transitoire et joue donc un rôle important dans la reproductibilité de la méthode. La mesure de l'élasticité du foie par la sonde XL est significativement plus basse que celle mesurée par la sonde M (de Ledingham, Wong et al. 2012). Une étude de l'équipe a démontré une variabilité significative de la mesure de l'élasticité du foie en fonction de la position de la sonde chez 442 patients (Ingiliz, Chhay et al. 2009). La prise alimentaire peut entraîner une augmentation de l'élasticité du foie non associée à la fibrose hépatique (Mederacke, Wurstthorn et al. 2009; Arena, Lupsor Platon et al. 2013). Dans notre étude, les examens réalisés par les examinateurs différents ont été réalisés avec la sonde M avec, en médiane, 30 minutes d'écart entre la première et la seconde observation. Les patients n'ont pas consommé d'aliments entre les deux examens. La sonde devrait être positionnée de façon perpendiculaire à la peau sur l'espace intercostal situé à l'intersection de la xiphoïde et de la ligne axillaire médiane. Cependant, la localisation exacte choisie par l'opérateur pour effectuer la mesure de l'élasticité du foie et la phase respiratoire pendant acquisition des mesures n'ont pas été collectées.

Dans notre étude, les mesures entre les opérateurs étaient bien corrélées et la discordance d'au moins deux stades de fibrose a été faible. Parmi les 74 patients considérés comme cirrhotiques par au moins un opérateur, seulement quatre patients étaient classés comme fibrose significative (F=2) et aucun comme fibrose minime (F0F1) par l'autre opérateur. En prenant en compte ces données la variabilité de l'élastographie transitoire peut être associée à l'interprétation artificielle des seuils pour cette méthode. Dans notre étude, la fibrose a été estimée en fonction de la classification proposée par Castera *et al*, validée pour l'hépatite chronique par le VHC (Castera, Vergniol et al. 2005). Nous avons répété l'analyse en utilisant d'autres classifications proposées par d'autres auteurs [(Ziol, Handra-Luca et al. 2005) (Fraquelli, Rigamonti et al. 2007)] et la variabilité inter-observateur de la méthode était similaire (Tableaux supplémentaires de l'article).

L'une des limites de notre étude a été l'absence d'une biopsie hépatique ou d'un biomarqueur validé pour évaluer la performance diagnostic de l'élastographie transitoire. Nous n'avons pas évalué non plus l'impact de la stéatose et de l'inflammation sur la variabilité interobservateur de la mesure de l'élasticité du foie. Le point fort de notre étude est le fait d'avoir inclus uniquement des patients mono-infectés par le VHC. Les études précédentes ont évalué la reproductibilité de cette méthode chez des patients qui avaient une maladie chronique du foie de causes diverses. Comme la performance diagnostique et les seuils proposés pour l'élastographie transitoire ont varié en fonction de la maladie hépatique évaluée, la reproductibilité de cette méthode peut probablement varier aussi en fonction de l'étiologie de la maladie chronique du foie. Notre étude est la première étude qui a-t-il évalué la variabilité inter-observateur de l'élastographie transitoire chez une population homogène des patients infecté par le VHC.

IV-6. Article 2: "Aspartate-to-platelet ratio index (APRI) variability as a biomarker of fibrosis in patients with chronic hepatitis C"

Title page

Aspartate-to-platelet ratio index (APRI) variability as a biomarker of fibrosis in patients with chronic hepatitis C

Short title: APRI variability in HCV patients

Author Names:

Hugo Perazzo¹, Raluca Pais^{1,2}, Mona Munteanu³, Yen Ngo³, Denis Monneret⁴, Françoise Imbert-Bismut⁴, Joseph Moussalli¹, Pascal Lebray¹, Yves Benhamou¹, Dominique Thabut¹, Vlad Ratziu¹, Victor de Ledhingen⁵, Thierry Poynard¹ for the FibroFrance Group and EPIC3 Group.

Department/Institution Names:

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Hepatology Department, Paris, France

² INSERM & Université Pierre et Marie Curie - Univ Paris 06, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

³ BioPredictive, Paris, France

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biochemistry Department, Paris, France

Corresponding Author: Thierry Poynard, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France; tpoynard@teaser.fr; Tel: +33 1 42 16 10 22.

Authors' involvements:

TP: study concept and design; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting; study supervision. HP: acquisition of data; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting. MM: analysis and interpretation of data; statistical analysis and critical revision of the manuscript. RP, DM, YN, JM, PL, YB, DT, VDL: acquisition of data. VR, FIB: critical revision of the manuscript.

Conflict of Interest Statement

TP is the inventor of FibroTest/SteatoTest and the founder of BioPredictive, the company that markets these tests. Patents belong to the French Public Organization Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. MM and YN are BioPredictive employees.

RP, DM, JM, PL, YB, DT, FIB and VR: These authors have no conflict of interest to disclose

Grant Support

This work was supported by funding from Association pour la Recherche sur Maladies Virales et Hépatiques (ARMHV).

List of Abbreviations

APRI, aspartate-to-platelet ratio index

AST, aspartate transferase

ALT, alanine transferase

AUROC, area under the receiver operating curves

BMI, body mass index

CDT, carbohydrate deficient transferrin

CHC, chronic hepatitis C

DILI, drug-induced liver injury

HBsAg, antigen HBs

HCV, hepatitis C virus

HIV, Human immunodeficiency virus

IU, international units

ULN, upper limit of normal

wAUROC, weighted area under the receiver operating curves

Word count

Abstract: 281; Manuscript 3588;

4 Tables 1 Figure; 29 references.

Abstract

Background & Aims: The aspartate-to-platelet ratio index (APRI) is a validated, non-patented blood test for diagnosing fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. We assess the impact of two limitations, the variability of the upper limit of normal for aspartate aminotransferase (AST-ULN) and the risk of overestimating fibrosis stage due to necroinflammatory activity.

Methods: The variability of AST-ULN was assessed by an overview of the literature and an assessment of AST-ULN in 2 control populations 7521 healthy volunteers and 393 blood donors. We assessed the impact of AST-ULN variability on APRI performance for estimating fibrosis prevalence and on the Obuchowski measure using individual data of 1651 patients with APRI, FibroTest and biopsy.

Results: The overview and the analysis of the control populations found that ULN-AST ranged from 26 to 49 IU/L according to gender, body mass index and serum cholesterol. When this AST-ULN variability was applied to the chronic hepatitis group, the prevalence of advanced fibrosis and cirrhosis as presumed by APRI varied ($P<0.001$) from 34.7% to 68.5%, and from 11.4% to 32.3%, respectively. This spectrum effect induced variability in APRI performance, which could be similar 0.862 (if $\text{AST-ULN}=26$ IU/L) or lower 0.820 ($\text{AST-ULN}\geq 30$ IU/L) than the stable FibroTest performance (0.867; $P=.35$ and $P<0.0001$ respectively). When applied to 18 acute hepatitis C patients, the rate of false positives of APRI varied from 0% to 61% due to AST-ULN.

Conclusion: The AST-ULN variability is high due to the variability of metabolic risk factors between the different control groups. This variability induces a spectrum effect, which could cause misleading interpretations of APRI performance for the staging of fibrosis, comparisons of APRI with other non-invasive tests, and estimates of false positive rate.

Keywords: hepatitis C virus; fibrosis; diagnosis

Introduction

The aspartate-to-platelet ratio index (APRI) ¹ is a validated, non-patented blood test for diagnosing fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C (CHC).² Its advantages are its low cost, availability, and significant diagnostic performance for fibrosis staging.

APRI has some well-documented limitations, including lower fibrosis staging and prognostic performances compared with proprietary blood tests such as FibroTest ²⁻⁶ and with liver stiffness measurement by elastography, such as transient elastography using Fibroscan.⁶⁻⁸

Two other limitations have never been re-examined.⁹ The first of these limitations, which was acknowledged by the inventors of APRI 10 years ago, is uncertainty regarding the appropriate definition of the upper limit of normal for aspartate aminotransferase (AST-ULN), as serum AST results are expressed as ratios of the ULN and not as international units (IU). This risk of greater interlaboratory variability of ULN versus IU has been already demonstrated in blood donor screening using alanine aminotransferase ¹⁰, and in the definition of drug-induced liver disease (DILI).¹¹

The second limitation is uncertainty regarding whether to include a transaminase in a fibrosis biomarker panel, which can increase the risk of fibrosis staging false positives in case of necroinflammatory activity flare.¹² This risk has been extensively identified for transient elastography but not for APRI.^{13, 14} Furthermore, the non-invasive assessment of necroinflammatory activity (grade), independent of fibrosis staging, is still important in patients with CHC, since treatment indication is discussed in patients without advanced fibrosis but with moderate or severe necroinflammatory activity.¹⁵ Contrary to fibrosis stage, a high activity grade is associated with a better virological response to treatment compared

with patients with low or no activity.¹⁶ Lastly, there is a risk of over-interpretation of fibrosis improvement after antiviral treatment, if the impact on necroinflammatory activity is not taken into account.¹⁷

We aimed to assess the impact of these two limitations, AST-ULN variability and necroinflammatory activity as a confounding factor, on APRI diagnostic performance for fibrosis staging in patients with chronic hepatitis C.

Methods

The Chart flow of populations used to assess the variability of AST-ULN definition and its impact on APRI diagnostic performances is detailed in Figure 1.

Variability of ULN definition

We first aimed to estimate the variability of AST-ULN observed in control populations. We used two methods: an overview of the literature that recommended AST-ULN, and an original assessment of AST-ULN in 2 control populations from our institution with individual data, which enabled the recommendations of Dutta *et al.*¹⁸ to be applied.

Secondly, we assessed the impact of AST-ULN variability on APRI performance for estimating fibrosis stage prevalence according to three definitions of AST-ULN from the literature: the two extreme range values, and the median value.

Thirdly, we assessed the impact of AST-ULN variability on APRI performance for fibrosis staging. The predetermined hypothesis was that ULN variability induced a risk of spectrum effect that could not be detected by the usual non-weighted area under the receiver operating curves (AUROC). Therefore if the spectrum effect is not taken into account, comparisons with other non-invasive methods are misleading.^{19, 20}

Literature review

We searched the references of related ALT overview [10](#), [11](#), [18](#) and PubMed using the keywords "AST, upper limit normal", up to October 10, 2013. Inclusion criteria for the studies were as follows: a minimum of 1000 healthy volunteers, with exclusion of chronic hepatitis C and B, and with a description of the main characteristics possibly associated with AST values: age, gender, daily alcohol consumption, and metabolic factors (body mass index (BMI), cholesterol, triglycerides and type 2 diabetes).

Control populations with individual data (Table 1 and supplementary file Tables S1, S2, S3 and S4)

We used two populations of apparently healthy volunteers, in whom risk factors were prospectively included: blood donors and a study in general population. These populations were part of the FibroFrance project (NCT01927133), which included an assessment of applicability and performance of non-invasive biomarkers. [21](#), [22](#)

The population of blood donors included 393 consecutive subjects with AST measurements. The general population included 7521 consecutive, apparently healthy volunteers, over 40 years of age. They were representative of the French general population seen for a free screening program in two French Social Security health examination centers, with 45% declaring prescription drug or over-the-counter drug use (Table 1).

We pooled these controls and assessed the variability risk factors, creating two groups, one using and the other not using the following recommended criteria of Dutta *et al.* for reference control groups [18](#): normal body weight (lower than 27 kg/m²), no underlying acute or chronic illnesses (negative for HBsAg, anti-HCV antibodies, and anti-HIV-antibodies), no significant alcohol consumption (less than 20 g of alcohol per day), and no intake of

prescription or nonprescription medicines, herbal compounds, or dietary supplements. These two groups were named "non-selected controls" and "selected controls".

Spectrum effect induced by variability impact of AST-ULN variability in CHC patients

When the definition of AST-ULN changes, the APRI value changes linearly. Therefore for the same recommended cutoffs, the prevalence of fibrosis stage as estimated by APRI changes, even if the ranking of patients remains the same. To demonstrate this spectrum effect, we calculated the presumed stage distribution (METAVIR scoring system) according to APRI cutoffs identified by a recent overview²: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 for F1, F2, F3 and F4, respectively. In this overview, the definition of AST-ULN was not discussed. We then used the Obuchowski measure to take into account this spectrum effect.^{19, 20} This measure is a multinomial version of the AUROC. With N categories of the gold standard outcome (i.e. histological fibrosis stage) and AUROC_{st} (the estimate of the AUROC of diagnostic tests for differentiating between categories s and t) the Obuchowski measure is a weighted average of the $N(N-1)/2$ different AUROC_{st} corresponding to all the pairwise comparisons between 2 of the N categories. Each pairwise comparison between stages was weighted (wAUROC) to take into account the distance between stages. Finally, using classical non-weighted AUROCs for advanced fibrosis and cirrhosis and the Obuchowski measure, we compared the APRI performance according to the 3 values of AST-ULN cutoffs, and to those of FibroTest, a validated biomarker (5-component panel) with predetermined cutoffs that are not dependent on the normal values of one component.^{21, 22} We used individual patients from previously published studies on biomarker validation: the EPIC study²³ and the Bordeaux cohort⁶. The characteristics of these cohorts are summarized in Supplementary File Table S5.

Impact of necrotico-inflammatory grade on fibrosis as estimated by APRI

When assessing stiffness measurements with transient elastography in acute viral hepatitis, we used the individual data published by Arena *et al.* to assess the impact of necrosis and ULN definition on the false positive rate of APRI for the diagnosis of fibrosis. In order to specifically analyze the impact of AST, the mean platelet count value given by the authors was used for the APRI assessment at the 3 points of 240, 248 and 256 $\times 10^3 / \text{mm}^3$, respectively.¹⁴

Statistical methods

Comparisons used the Student's t-test for univariate analysis, and logistic regression analysis for multivariate analysis. The non-weighted AUROCs were estimated by the empirical (nonparametric) method of DeLong *et al.*, which is equivalent to the Mann-Whitney test statistic, and compared using the paired method.²⁴ To estimate the spectrum bias potentially induced by the variability in AST-ULN definition, the weighted AUROCs and the Obuchowski measures were estimated as previously described.^{19, 20} NCSS statistical software (NCSS, Kaysville, UT, USA) and R software (<http://CRAN.R-project.org>) were used.

Results

Literature overview

Out of 181 articles, only two studies were identified that had more than 1000 apparently healthy volunteers.^{25, 26}

One of these studies ²⁵, which included 2340 healthy volunteers, was excluded, as it only stated: "Subjects were considered to have abnormal liver tests if they were found to have ALT or AST values above normal range (standardized by the Johns Hopkins hospital laboratory) on their initial laboratory evaluation. Transaminases > 60 IU/L was considered as 2 times normal." Therefore there were no details concerning the assessment of ULN, which

was considered to be 30 IU/L. Analyses found male gender, triglycerides ≥ 200 mg/dl, BMI ≥ 30 and age < 60 years to be factors independently associated with transaminase values, but without differentiating AST from ALT.

Another frequently cited reference was excluded. The AST-ULN of the US NHANES III laboratory was ≤ 37 U/L (37° C) for males and ≤ 31 U/L (37° C) for females. These cutoffs were those furnished by manufacturers of the Hitachi 737 automated analyzer (Boehringer Mannheim Diagnostics). Therefore in a virtual population with a gender ratio of one, the median would be 34 IU/L. There were no details on the statistical methods or the control subjects' characteristics.²⁷

Only one study satisfied the inclusion criteria and was included.²⁶ This large population of Korean blood donors (n= 411,240) defined the AST-ULN as the 95th percentile in the subpopulations stratified by the four independent factors (gender, cholesterol and BMI). The extreme of these AST-ULN ranged from 26 IU/L in women with BMI < 23 kg/m² and total cholesterol < 200 mg/dL to 49 IU/L in men with BMI ≥ 30 kg/m² and total cholesterol ≥ 240 mg/dL.

According to this overview, three cutoffs (26, 34 and 49 IU/L) were used for assessing the impact of ULN variability for estimating fibrosis prevalence, regardless of gender: a low ULN (ULN-26), a median cutoff (ULN-34) and a higher cutoff (ULN-49).

Risk factors and AST-ULN in control populations (Table 1 and Figure 1)

Of the 393 non-selected blood donors, 123 (31%) had at least one risk factor, and 270 (69%) were selected controls.

Of the 7521 non-selected controls of the general population, which had, as expected, many more subjects than in the blood donors, 4936 (66%) had at least one risk factor and 2585 (34%) were selected controls.

In the non-selected controls, the predetermined risk factors of male gender, BMI and cholesterol were validated and were all significantly associated with AST ($P < 0.0001$ in multivariate analysis) (Supplementary Table S1). Using the same statistical method (95% percentile), the extreme of the AST-ULN ranged from 31 IU/L in women with BMI $< 23 \text{ kg/m}^2$ and total cholesterol $< 200 \text{ mg/dL}$ to 48 IU/L in men with BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ and total cholesterol $\geq 240 \text{ mg/dL}$ (Supplementary Table S2).

In the selected controls (Supplementary Table S3), the following factors were still associated with elevated AST: male gender ($P < 0.0001$), high triglycerides ($P < 0.0001$), high cholesterol ($P = 0.003$), high creatinine ($P < 0.0001$) and carbohydrate deficient transferrin (CDT) ($P = 0.01$).

The extreme of the AST-ULN ranged from 30 IU/L in women with BMI $< 23 \text{ kg/m}^2$ and total cholesterol $< 200 \text{ mg/dL}$ to 37 IU/L in men with BMI $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ and total cholesterol $\geq 240 \text{ mg/dL}$ (Supplementary Table S2).

Prevalence of Fibrosis stages (METAVIR) as presumed by APRI according to the definition of AST-ULN

The chronic hepatitis group included 1651 patients (Figure 1). The prevalence of advanced fibrosis (Stages F2F3F4) and cirrhosis (F4) as presumed by APRI varied from 34.7% to 68.5%, and from 11.4% to 32.3% according to the AST-ULN definition, respectively (Table 2).

Performance of APRI for the staging of fibrosis according to the AST-ULN definition

When applied to the chronic hepatitis group, the performance (Obuchowski measure) of APRI for the staging of fibrosis using biopsy as a gold standard varied significantly, according to the definition of AST-ULN, from 0.820 to 0.862 (Table 3 and details of AUROCs in Supplementary Table S6).

When non-selected controls were used, FibroTest performance was higher than APRI performance for all AST-ULN cutoffs, except for the lowest (ULN-26) ($P=0.35$). When selected controls were used, FibroTest performance was higher than APRI performance (0.867 vs. 0.850; $P=0.001$), assessed with the lowest AST-ULN (30 IU/L) (Table3).

Impact of necroinflammatory grade on fibrosis as estimated by APRI

When applied to acute hepatitis C patients, the APRI rate of false positives was the same for alanine transferase (ALT) measure at peak for all ULN and APRI cutoffs, and varied from 61% to 100% at the second sample (50% ALT decrease) and from 0% to 61% at the third sample, the end of follow-up (Table 4).

Discussion

The APRI is a non-patented biomarker blood test that is widely used for assessing fibrosis stage in chronic liver disease and is recommended in patients with CHC.² Surprisingly, APRI variability has never been assessed despite the existence of two rational limitations: 1) the inclusion of AST expressed in ULN, which is a recognized source of artificial interlaboratory discordance for ALT ⁹⁻¹¹; and 2) the risk of assessing both fibrosis and necroinflammatory activity, as this confounding feature is highly associated with AST serum activity.¹⁷

Variability in AST-ULN definition

Our results confirmed the wide range of AST-ULN definitions in the few articles identified, from 26 to 49 IU/L. Studies estimating the prevalence of cirrhosis varied from 11% to 32%, and from 35% to 70% for advanced fibrosis.

Our results were in accordance with the Dutta *et al.* recommendations, as the AST-ULN range was narrowed, reaching 30-37 IU/L in selected controls versus 31-48 IU/L in non-selected controls.

Impact on APRI performance

Despite these recommendations of reduced variability, they did not prevent the impact of the remaining ULN variability. Even AST-ULN changes less than five IU/L (30 to 34, or 34 to 37 IU/L) dramatically changed the APRI Obuchowski measures, and therefore its comparison with FibroTest, a blood test that fixed predetermined cutoffs, regardless of the liver disease (Table 3). As with the ALT and DILI definitions [18](#), it is therefore highly recommended that IU/L and not ULN be used when incorporating AST in blood test panels.[9-](#)
[12](#) If not re-examined, the conclusions of numerous APRI performance assessments would be misleading and unable to be exported to other laboratories and populations.

As recommended for ALT [10, 18](#), it may also be possible to minimize AST-ULN variability by 1) asking each lab to follow the manufacturers' recommendations; and 2) assuring that manufacturers of different analyzers establish the reference interval based on rigorous criteria and a strictly defined reference population. One advantage of some patented blood tests on APRI is the publication of pre-analytical and analytical procedures, the description of control populations and the specifications of authorized analyzers and kits.[21, 22](#)
[28](#)

Impact of necrotico-inflammatory grade on fibrosis as estimated by APRI

Pathologists succeeded in separating the assessment of fibrosis stage from activity grade in a validated scoring system 40 years after the invention of liver biopsy.²⁹ It seems hazardous to propose a panel of biomarkers such as APRI that mixes fibrosis and activity biomarkers, without an explanation of its limitations. The results of repeated APRI values based on the spontaneous cure of acute viral hepatitis enabled the risk of false positives for fibrosis staging to be estimated. As expected, this risk was high at the third sample, despite an ALT lower than 2 ULN (not defined in this study), with 44% to 61% of APRI still not normalized and >0.5, which could be interpreted as a minimal fibrosis stage. Even 37% of APRI results calculated with an AST-ULN-26 were > 1, which is presumed septal fibrosis. This is a clinically important limitation in CHC for staging F0 F1 and F2 in patients with significant activity. This limitation is not present in blood tests such as FibroTest, for which a specific test for grading (ActiTest) was validated versus ALT.^{4, 12}

Limitations

We acknowledge several limitations of our study, which is a retrospective study analyzing 5 prospective groups of subjects. In addition, data were extracted for the acute viral group from the publication that gave details on individual AST values. The strength of the design however was that it covered a wide spectrum of fibrosis prevalence, from healthy volunteers without any risk factors to patients who were previous non-responders.

We focused on the variability of AST in the different groups but did not assess the possible APRI variability attributable to platelet counts, such as acute inflammation or treatment. Patients in the acute hepatitis group with fibrosis risk factors were not included, but no biopsies were performed at the end of follow-up, and one hepatitis B patient had an elevated liver stiffness measurement (10 kPa) despite normalization of ALT.¹⁴

In conclusion, our study observed that the AST-ULN variability cutoff is high and is associated with the heterogeneity of metabolic risk factors between the different control groups. This variability induces a spectrum effect, which could cause misleading interpretations of APRI performance for the staging of fibrosis, and unfair comparisons of APRI with other non-invasive tests.

References

1. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-526.
2. Chou R, Wasson N. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2013;158:807-820.
3. Poynard T, Ratziu V, Munteanu M. Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2013;159:370-371.
4. Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp Hepatol* 2004;3:8.
5. Ngo Y, Munteanu M, Messous D, et al. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2006;52:1887-1896.
6. 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.

7. Malik R, Lai M, Sadiq A, et al. Comparison of transient elastography, serum markers and clinical signs for the diagnosis of compensated cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1562-1568.
8. Gara N, Zhao X, Kleiner DE, et al. Discordance among transient elastography, aspartate aminotransferase to platelet ratio index, and histologic assessments of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:303-308.
9. Le Calvez S, Thabut D, Messous D, et al. The predictive value of Fibrotest vs. APRI for the diagnosis of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:862-863; author reply 3.
10. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, et al. 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* 1998;27:1213-1219.
11. M'Kada H, Munteanu M, Perazzo H, et al. 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* 2011;60:290-295.
12. Poynard T, Munteanu M, Ngo Y, et al. ActiTest accuracy for the assessment of histological activity grades in patients with chronic hepatitis C, an overview using Obuchowski measure. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34:388-396.
13. 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.

14. Arena U, Vizzutti F, Corti G, et al. Acute viral hepatitis increases liver stiffness values measured by transient elastography. *Hepatology* 2008;47:380-384.
15. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009;49:1335-1374.
16. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;361:580-593.
17. Poynard T, Ngo Y, Munteanu M, et al. Biomarkers of liver injury for hepatitis clinical trials: a meta-analysis of longitudinal studies. *Antivir Ther* 2010;15:617-631.
18. Dutta A, Saha C, Johnson CS, et al. Variability in the upper limit of normal for serum alanine aminotransferase levels: a statewide study. *Hepatology* 2009;50:1957-1962.
19. Poynard T, Halfon P, Castera L, et al. Standardization of ROC curve areas for diagnostic evaluation of liver fibrosis markers based on prevalences of fibrosis stages. *Clin Chem* 2007;53:1615-1622.
20. Lambert J, Halfon P, Penaranda G, et al. How to measure the diagnostic accuracy of noninvasive liver fibrosis indices: the area under the ROC curve revisited. *Clin Chem* 2008;54:1372-1378.
21. Poynard T, Munteanu M, Deckmyn O, et al. Applicability and precautions of use of liver injury biomarker FibroTest. A reappraisal at 7 years of age. *BMC Gastroenterol* 2011;11:39.
22. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, et al. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol* 2010;10:40.

23. Poynard T, Munteanu M, Colombo M, et al. FibroTest is an independent predictor of virologic response in chronic hepatitis C patients retreated with pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in the EPIC(3) program. *J Hepatol* 2011;54:227-235.
24. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-845.
25. Patt CH, Yoo HY, Dibadj K, et al. Prevalence of transaminase abnormalities in asymptomatic, healthy subjects participating in an executive health-screening program. *Dig Dis Sci* 2003;48:797-801.
26. Sohn W, Jun DW, Kwak MJ, et al. Upper limit of normal serum alanine and aspartate aminotransferase levels in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:522-529.
27. Gunter EW, Lewis BG, Koncikowski SM. Laboratory procedures used for the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988–1994. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health, National Center for Health Statistics. 1996.
28. Imbert-Bismut F, Messous D, Thibault V, et al. Intra-laboratory analytical variability of biochemical markers of fibrosis (Fibrotest) and activity (Actitest) and reference ranges in healthy blood donors. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:323-333.
29. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.

Figures Legends

Figure 1. Chart flow of populations used to assess the variability of AST-ULN definition and its impact on APRI diagnostic performances

Table 1. Characteristics of subjects in the healthy volunteers groups

Subjects	Blood donors	General population	All
Non-selected controls (n)	393	7521	7914
AST variability risk factors	n (%)		
Drug	84 (21.1)	3385 (45.0)	3469 (43.8)
BMI ≥ 28 kg/m ²	45 (11.5)	1897 (25.3)	1942 (24.6)
Alcohol ≥ 20 g/day	5 (1.3)	1312 (17.5)	1317 (16.7)
HBV or HCV	0 (0)	41 (0.6)	41 (0.5)
At least one missing data	0 (0)	31 (0.4)	31 (0.4)
Excluded (at least one risk factor)	123	4936	5059 (63.9%)
Selected controls (n)	270	2585	2855 (36.1%)
Characteristics (no risk factor) n (%) or mean (95% CI)			
Gender male	160 (59.3)	1454 (56.3)	1614 (56.5)
Caucasian	NA	2300 (89.0)	2300 (89.0)
Alcohol consumption			
None	62 (23.0)	639 (24.7)	701 (24.6)
>0 - <20 g/day	208 (77.0)	1946 (75.3)	2154 (75.4)
Age, years	33.2 (31.8-34.7)	55.2 (54.9-55.6)	53.2 (52.7-53.6)
Body Mass Index, Kg/m ²	22.8 (22.5-23.1)	23.7 (23.6-23.8)	23.6 (23.5-23.7)
AST, IU/L	25.4 (24.1-26.7)	23.8 (23.5-24.1)	23.9 (23.6-24.2)
ALT, IU/L	23.1 (21.5-24.7)	25.1 (24.6-25.6)	24.9 (24.4-25.4)
GGT, IU/L	19.8 (17.8-21.8)	30.5 (29.2-31.8)	29.5 (23.0-19.5)
Total bilirubin, μ mol/L	10.4 (9.7-11.2)	12.1 (11.9-12.3)	11.9 (11.8-12.1)
Glucose, mmol/L	5.5 (5.2-5.9)	5.4 (5.3-5.4)	5.4 (5.3-5.4)
Triglycerides, mmol/L	1.0 (0.9-1.1)	1.2 (1.1-1.2)	1.2 (1.1-1.2)
Cholesterol, mmol/L	4.8 (4.7-4.9)	5.7 (5.7-5.8)	5.7 (5.6-5.7)
Creatinine, μ mol/L	NA	91.0 (90.5-91.5)	91.0 (90.5-91.5)
Carbohydrate deficient transferrin (CDT) ¹ , %	NA	1.5 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
CDT Greater than 1.6% ¹	NA	105 (25.3)	105 (25.3)

¹ Assessed in 415 subjects, ALT, alanine transferase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; CDT, carbohydrate deficient transferrin, GGT, gamma-glutamyl transferase ; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus

Table 2. Prevalence of Fibrosis stages (METAVIR) presumed by APRI according to the definition of AST Upper limit of the normal (ULN) in the Chronic Hepatitis C group

Stage		ULN 26 IU/L		ULN 34 IU/L		ULN 49 IU/L	
APRI Cutoff		n	%	n	%	n	%
<=0.5	F0	135	8.2%	259	15.7%	551	33.4%
0.5< <=1.0	F1	466	28.3%	580	35.1%	550	33.3%
1< <=1.5	F2	344	20.8%	288	17.4%	244	14.8%
1.5< <=2.0	F3	194	11.8%	182	11.0%	116	7.0%
>2.0	F4	512	31.0%	342	20.7%	190	11.5%
Total		1651	100%	1651	100%	1651	100%

APRI, aspartate-to-platelet ratio index; AST, aspartate aminotransferase; ULN, upper limit of normal.

Differences between stages' prevalences were all significant between ULN-26 vs ULN-34 ($P<0.0001$), ULN-34 vs ULN-49 ($P<0.0001$), and ULN-26 vs ULN-49 ($P<0.0001$).

Table 3. Performance (Obuchowski measure) of APRI for the staging of fibrosis according to the definition of AST ULN compared to FibroTest, using biopsy as a Gold Standard in the Chronic Hepatitis C group (n=1651)

APRI (n=1651)			FibroTest (n=1651)		Comparison APRI versus FibroTest	
AST-ULN	Measure	95% CI	Measure	95% CI	Z value	P-value
ULN 26 IU/L	0.862	0.858-0.870	0.867 ²	0.859-0.875	0.99	0.35
ULN 30 IU/L	0.850 ²	0.842-0.858	0.867 ²	0.859-0.875	3.27	0.001
ULN 34 IU/L	0.839	0.831-0.847	0.867 ²	0.859-0.875	5.48	<0.0001
ULN 37 IU/L	0.833 ³	0.825-0.841	0.867 ²	0.859-0.875	6.74	<0.0001
ULN 49 IU/L	0.820	0.814-0.826	0.867 ²	0.859-0.875	9.39	<0.0001

APRI, aspartate-to-platelet ratio index; AST, aspartate aminotransferase; ULN, upper limit of normal.

The cutoffs ULN-26, ULN-34 and ULN 49 derived from literature review; ULN-30 and ULN-37 derived from selected controls

1 Cutoffs of FibroTest were predetermined and not variable

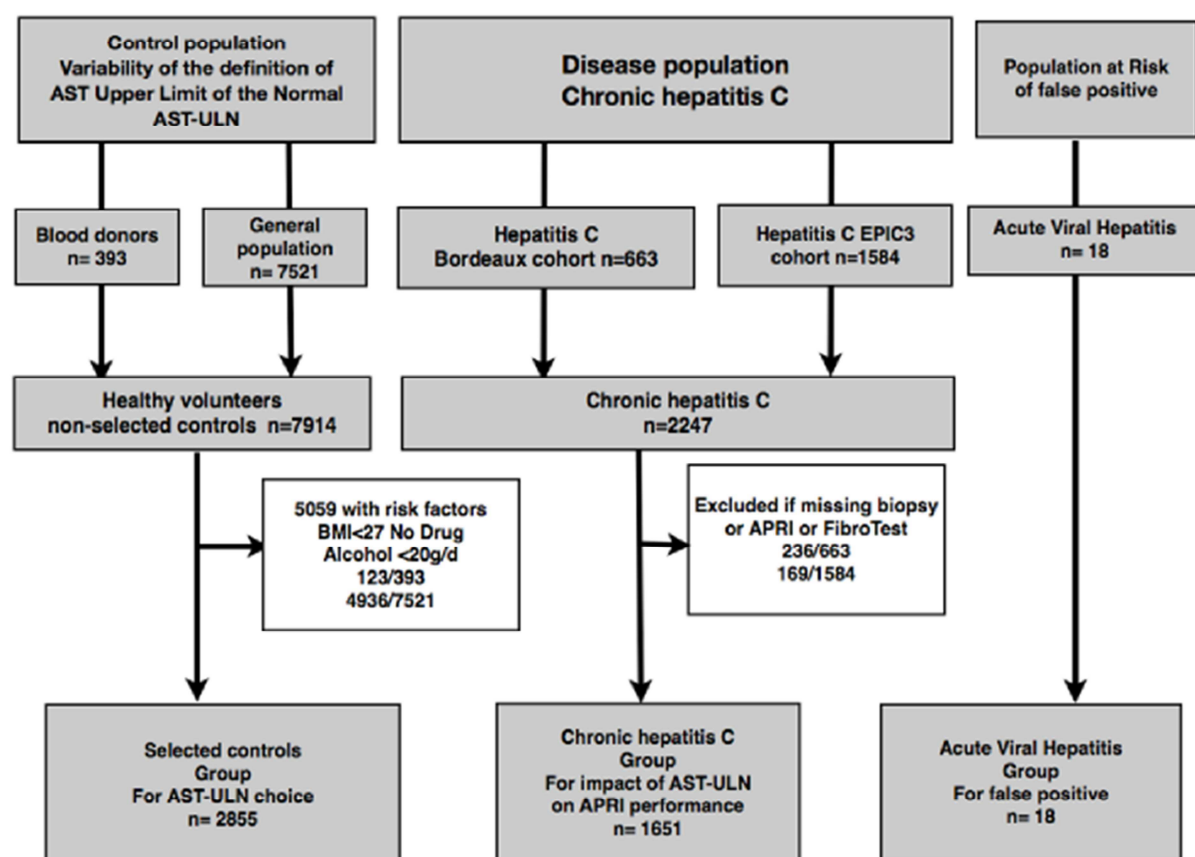
2 $P < 0.0001$ for ULN-30 vs ULN-26, and $P < 0.0001$ for ULN-30 vs ULN-34

3 $P = 0.003$ between ULN-37 ULN-34, and $P < 0.0001$ for ULN-37 vs ULN-49

Table 4. False positive rate of APRI according to definition of AST Upper limit of the normal (ULN) and to necrotico-inflammatory activity in the Acute Hepatitis group

APRI Cutoff	Peak ALT (n=18)			50% decrease ALT (n=18)			<= 2xULN ALT (n=18)		
	ULN-26	ULN-34	ULN-49	ULN-26	ULN-34	ULN-49	ULN-26	ULN-34	ULN-49
>0.5	100% (18)	100% (18)	100% (18)	100% (18)	94% (17)	94% (17)	61% (13)	61% (11)	44% (8)
>1.0	100% (18)	100% (18)	100% (18)	94% (17)	83% (15)	78% (14)	37% (7)	0% (0)	0% (0)
>1.5	100% (18)	100% (18)	100% (18)	83% (15)	61% (13)	67% (12)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
>2.0	100% (18)	100% (18)	100% (18)	61% (13)	67% (12)	61% (11)	0% (0)	0% (0)	0% (0)

Figure 1.



IV-6-1. Tableaux supplémentaires de l'article 2

Supplementary Tables: Variability of ULN according to the heterogeneity of control groups and statistical methods

The change in methods successively used at the Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière hospital in Paris, France is an example of how laboratories generate the ULN. Between 1993 and 1996, there was a common threshold of 45 IU/L for AST-ULN, which was used both for males and females. This threshold corresponded to the mean + 2 standard deviations (SD) of a control population given by the manufacturer and after exclusion of the 5% extreme values. There was no scientific publication describing this control population. In January 1996, the AST-ULN was based on a study of 2200 apparently healthy blood donors who were negative for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus markers. It included 1171 men and 880 women. The AST-ULN was 27 IU/L in women and 32 IU/L in men. These were determined by the mean +1 SD after exclusion of the 5% extreme values.

Supplementary Table S1. Factors associated with AST and ALT in non-selected controls (n=7914)

Subjects	AST		ALT	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
Drug	<0.0001 ¹	P=0.21 ¹	0.048	0.25
Yes 3469	22 (22-22) ²	0.0037 ³	23 (22-23)	-0.0049
No 4445	23 (23-23)		23 (23-24)	
Gender	<0.0001	P <0.0001	<0.0001	<0.0001
Female 3543	21 (21-21)	0.0511	19 (19-20)	0.123
Male 4371	24 (24-24)		27 (26-27)	
Alcohol	<0.0001	0.01	<0.0001	0.39
>=20g/day 1317	24 (23-24)	0.0096	25 (25-26)	-0.005
<20g/day 6569	22 (22-23)		23 (22-23)	
Age, years	0.07 ⁴ (<0.0001) ¹	0.0007 (<0.0001)	0.006 (<0.0001)	-0.001 (<0.0001)
Body Mass Index, Kg/m ²	0.11 (<0.0001)	0.0021 (<0.0001)	0.30 (<0.0001)	0.0110 (<0.0001)
Glucose, mmol/L	0.06 (<0.0001)	-0.0032 (0.03)	0.19 (<0.0001)	0.0126 (<0.0001)
Triglycerides, mmol/L	0.12 (<0.0001)	0.0016 (<0.0001)	0.20 (<0.0001)	0.0143 (<0.0001)
Cholesterol, mmol/L	0.05 (<0.0001)	0.0015 (0.002)	0.05 (<0.0001)	0.0127 (<0.0001)
Creatinine, µmol/L	0.18 (<0.0001)	0.0004 (0.003)	0.20 (<0.0001)	-0.0001 (0.44)
Carbohydrate deficient transferrin ⁵ , %, n=1104	0.19 (<0.0001)	0.0390 (<0.0001)	0.13 (0.0001)	0.0382 (0.0008)

¹ P-Value ² Median (95% CI) ³ Regression coefficient ⁴ Spearman coefficient ⁵ In this multivariate model alcohol consumption is not included

Supplementary Table S2: value of AST (IU/L) in low, intermediate or high-risk group

	Lowest risk¹		Intermediate risk²		Highest Risk^{3,4}	
	95% percentile	mean (95% CI) n	95% percentile	mean (95% CI) n	95% percentile	mean (95% CI) n
Non-selected controls n=7914	31	21.2 (20.7-21.8) n=451	37	24.6 (24.4-24.9) n=7293	48	28.8 (26.3-31.2) n=170
Selected controls n=2855	30	21.5 (20.6-22.3) n=217	36	23.8 (23.5-24.1) n=2303	37	26.4 (25.1-27.6) n=335

¹ Lowest risk: female, total cholesterol < 200 mg/L and BMI < 23 Kg/m²

² Intermediate risk: not in the extreme groups

³ Highest risk: male, ≥ 240 mg/L and BMI ≥ 30 Kg/m² for non-selected

⁴ Highest risk: male, ≥ 240 mg/L and BMI ≥ 23 Kg/m² for selected

Supplementary Table S3: Factors still associated with AST in selected controls (declared less than 20g alcohol per day, BMI <27 kg/m² and no drug intake; n=2855)

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	AST mean (95% CI)	P value	Regression coefficient	P value
Gender		<0.0001		P<0.0001
Female	21 (21-21) ²		0.0364 ³	
Male	24 (23-24)			
Alcohol		0.20	0.0089	P=0.09
0	22 (22-23)			
0< <20g/day ⁵	23 (22-23)			
	Spearman R	P value	Regression coefficient	P value
Age	0.08	<0.0001	0.0009	<0.0001
Body Mass Index ⁶	0.08	0.003	-0.0004	0.69
Glucose	0.06	0.004	-0.0057	0.04
Triglycerides	0.13	<0.0001	0.0143	<0.0001
Cholesterol	0.06	0.002	0.0075	0.003
Creatinine	0.21	<0.0001	0.0010	<0.0001
Carbohydrate deficient transferrin ⁶ n= 407	0.09	0.08	0.0273	0.01

⁵ In this multivariate model alcohol consumption is not included as patients selected declared less than 20g/day

⁶ Patients selected had BMI <27

Supplementary Table S4. Characteristics of subjects in the healthy volunteers groups

Subjects	Blood donors	General population	All
Non-selected controls (n)	393	7521	7914
AST variability risk factors	n (%) or mean (95% CI)		
Drug	84 (21.1%)	3385 (45.0%)	3469 (43.8%)
BMI ≥ 28 kg/m ²	45 (11.5%)	1897 (25.3%)	1942 (24.6%)
Alcohol ≥ 20 g/day	5 (1.3%)	1312 (17.5%)	1317 (16.7%)
HBV or HCV	0 (0%)	41 (0.6%)	41 (0.5%)
At least one missing data	0 (0%)	31 (0.4%)	31 (0.4%)
Excluded (at least one risk factor)	123 (31%)	4936	5059 (63.9%)
Selected controls characteristics (no risk factor)	270	2585	2855 (36.1%)
Gender male (%)	160 (59.3%)	1454 (56.3%)	1614 (56.5%)
Caucasian	NA	2300 (89.0%)	2300 (89.0%)
Alcohol consumption			
None	62 (23.0%)	639 (24.7%)	701 (24.6%)
>0 - <20 g/day	208 (77.0%)	1946 (75.3%)	2154 (75.4%)
Age mean yr (95%CI)	33.2 (31.8-34.7)	55.2 (54.9-55.6)	53.2 (52.7-53.6)
Body Mass Index	22.8 (22.5-23.1)	23.7 (23.6-23.8)	23.6 (23.5-23.7)
AST	25.4 (24.1-26.7)	23.8 (23.5-24.1)	23.9 (23.6-24.2)
ALT	23.1 (21.5-24.7)	25.1 (24.6-25.6)	24.9 (24.4-25.4)
GGT	19.8 (17.8-21.8)	30.5 (29.2-31.8)	29.5 (23.0-19.5)
Total bilirubin	10.4 (9.7-11.2)	12.1 (11.9-12.3)	11.9 (11.8-12.1)
Glucose	5.5 (5.2-5.9)	5.4 (5.3-5.4)	5.4 (5.3-5.4)
Triglycerides	1.0 (0.9-1.1)	1.2 (1.1-1.2)	1.2 (1.1-1.2)
Cholesterol	4.8 (4.7-4.9)	5.7 (5.7-5.8)	5.7 (5.6-5.7)
Creatinine	NA	91.0 (90.5-91.5)	91.0 (90.5-91.5)
Carbohydrate deficient transferrin ¹	NA	1.5 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
Greater than 1.6% ¹	NA	105 (25.3%)	105 (25.3%)

¹ Assessed in 415 subjects

Supplementary Table S5. Characteristics of patients in the chronic hepatitis C groups

	EPIC3	Bordeaux	All
	n=1415	n=236	n=1651
Gender male n (%)	986 (70%)	236 (55%)	1115 (68%)
Age mean year (95%CI)	51 (50-51)	51 (50-53)	51 (51-51)
Body Mass Index kg/m ²	28 (27-28)	25 (24-26)	27 (27-27)
Stage METAVIR biopsy			
F0	0 (0%)	4 (2%)	4 (0.2%)
F1	0 (0%)	50 (21%)	50 (3%)
F2	390 (28%)	75 (32%)	465 (28%)
F3	417 (30%)	50 (21%)	467 (28%)
F4	608 (43%)	57 (24%)	665 (40%)
APRI-26 ULN	2.0 (1.9-2.1)	1.9 (1.5-2.3)	1.9 (1.8-2.0)
APRI-49 ULN	1.0 (1.0-1.1)	1.0 (0.8-1.2)	1.0 (1.0-1.1)
AST 10 ³ /mm ³	78 (75-80)	72 (64-80)	77 (74-80)
Platelets	183 (180-186)	211 (201-221)	187 (184-190)
FibroTest	0.66 (0.64-0.67)	0.53 (0.49-0.57)	0.64 (0.63-0.65)

Supplementary Table S6. Paired comparison of weighted AUROC vs adjacent stages according to definition of AST ULN

Weighted AUROCs; mean (SE)	APRI			FibroTest
	ULN 26 IU/L	ULN 34 IU/L	ULN 49 IU/L	
F1 vs F0	0.612 (0.142)	0.535 (0.139)	0.565 (0.127)	0.580 (0.158)
F2 vs F1	0.530 (0.033)	0.580 (0.034)	0.566 (0.025)	0.513 (0.028)
F3 vs F2	0.525 (0.016)	0.513 (0.014)	0.522 (0.012)	0.533 (0.017)
F4 vs F3	0.601 (0.015)	0.547 (0.015)	0.523 (0.013)	0.587 (0.016)
All paired comparisons: Obuchowski measure	0.862 (0.004) ¹	0.839 (0.004)	0.587 (0.016) ²	0.867 (0.004) ³

Obuchowski measure included all pairwise comparisons including the comparisons between non-adjacent stages.

Significance between Obuchowski measures:

¹ P<0.0001 for ULN-26 vs ULN-49 and ULN-26 vs ULN-49

² P<0.0001 between ULN-34 and ULN-49

³ P<0.0001 between FibroTest and ULN-34 and ULN-49; P=0.35 between FibroTest and ULN-24;

IV-6-2. Discussion de l'article 2

L'APRI (Wai, Greenson et al. 2003) est un biomarqueur validé pour le diagnostic d'une fibrose avancée ou une cirrhose chez les patient infectés par le VHC (Chou and Wasson 2013). Les principaux avantages de cette méthode sont sa performance diagnostique et son faible coût, la formule étant basée sur la concentrations sérique de l'ASAT et des plaquettes. Cependant, l'APRI utilise le résultat de l'ASAT exprimé en multiple de la limite de la normale, ce qui peut entraîner une variabilité inter-laboratoire (Piton, Poynard et al. 1998). De plus, l'estimation de la fibrose peut être surestimée par l'activité nécrotico-inflammatoire hépatique et l'utilisation d'une enzyme de cytolysse dans sa formule (Poynard, Munteanu et al. 2010).

Nos résultats ont confirmé le large spectre de définition de la limite supérieure de la normale (LSN) de l'ASAT qui a varié de 26 UI/L à 49 UI/L dans les articles publiés identifiés par une revue systématique de la littérature. Dans notre étude le diagnostic d'une cirrhose (APRI >2.0) ou d'une fibrose avancée (APRI > 1.5) a beaucoup varié en fonction de la LSN de l'ASAT. La prévalence de la cirrhose passait de 31% à 12%, respectivement en utilisant 26 UI/L et 49 UI/L comme LSN de l'ASAT. La prévalence d'une fibrose avancée a varié de 43% à 19% en fonction de la LSN de l'ASAT utilisé. Tous les patients qui avaient une hépatite aigüe seraient considérés comme cirrhotiques en utilisant ce biomarqueur pour estimer la fibrose du foie. La performance diagnostique du FibroTest, qui n'utilise pas des transaminases pour estimer la fibrose, était significativement supérieure à celle de l'APRI pour tous les seuils de l'ASAT à l'exception d'une LSN de 26 UI/L.

La limite principale de l'étude était la collecte retrospective des données des patients. L'étude a évalué la variabilité de l'APRI due à la variabilité de l'ASAT par la présence d'une inflammation. Cependant, notre étude n'a pas pu évalué la variabilité du biomarqueur à cause de la variabilité des plaquettes comme dans le cadre d'une thrombopénie sous traitement par

interferon. Le point fort est que l'étude a couvert un large spectre de prévalence de fibrose hépatique en allant des volontaires sains aux patients infectés par le VHC non répondeurs aux traitement antiviraux.

IV-7. Article 3: "Hepatic steatosis per non-invasive biomarkers leads to an overestimation of fibrosis based on liver stiffness measurement in type 2 diabetic patients"

Title page

Hepatic steatosis per non-invasive biomarkers leads to an overestimation of fibrosis based on liver stiffness measurement in type 2 diabetic patients

Short title: Steatosis overestimates liver stiffness

Author Names:

Hugo Perazzo^{1,2}, Mona Munteanu³, Yen Ngo³, Pascal Lebray¹, Elena Lukina¹, Noemi Seurat¹, Fanny Rutka⁴, Marion Couteau⁴, Sophie Jacqueminet⁵, Denis Monneret⁴, Françoise Imbert-Bismut⁴, Vlad Ratziu^{1,2}, Agnes Hartemann-Huertier⁵, Chantal Housset² and Thierry Poynard^{1,2} for the FLIP Consortium

Department/Institution Names:

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Hepatology Department, Paris, France

² INSERM & Université Pierre et Marie Curie - Univ Paris 06, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

³ BioPredictive, Paris, France

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biochemistry Department, Paris, France

⁵ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Diabetology Department,
Paris, France

⁶ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Dyslipidemia Department,
Paris, France

Authors Mona Munteanu, Vlad Ratziu, Chantal Housset and Thierry Poynard for the FLIP
Consortium

Corresponding Author:

Prof. Thierry Poynard,
47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France
E-mail: tpoynard@teaser.fr
Tel: +33 1 42 16 10 22
Fax: +33 1 42 16 14 27.

Authors' involvements:

Thierry Poynard and Chantal Housset: study concept and design; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting; study supervision. Hugo Perazzo: acquisition of data; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting. Mona Munteanu: acquisition of data, analysis and interpretation of data; statistical analysis and critical revision of the manuscript. Yen Ngo, Pascal Lebray, Elena Luckina, Noemi Seurat, Fanny Rutka, Marion Couteau, Sophie Jacqueminet and Denis Monneret: acquisition of data. Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratziu and Agnès Hartemann-Huertier: critical revision of the manuscript.

Disclosures:

Thierry Poynard is the inventor of FibroTest/SteatoTest and the founder of BioPredictive, the company that markets these tests. Patents belong to the French Public Organization Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Mona Munteanu and Yen Ngo are BioPredictive employees.

Hugo Perazzo, Pascal Lebray, Noemi Seurat, Fanny Rutka, Marion Couteau, Sophie Jacqueminet, Denis Monneret, Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratziu, Agnès Hartemann-Huertier and Chantal Housset: These authors have no conflict of interest to disclose.

Financial Support:

This study was supported by the European Community's Programme (FP7/2007-2013/no.HEALTHF2-2009-241762) for the project Fatty Liver: Inhibition of Progression (FLIP) and the Association pour la Recherche sur Maladies Virales Hépatiques (ARMHV).

Abbreviations:

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BMI, body mass index; CAP, Controlled Attenuated Parameter; CI, confidence interval; FLI, Fatty Liver Index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HSI, Hepatic Steatosis Index; LLN, lower limit of normal; LSM, liver stiffness measurement; OR, odds ratio; ULN, upper limit of normal

Word count:

Abstract: 250; Manuscript: 2858; References: 30; Tables: 4; Figures: 2; Supplementary File: 3 tables

Abstract

Background: Transient elastography based on liver stiffness measurement (LSM) and FibroTest are validated non-invasive methods to assess liver fibrosis.

Aims: To evaluate the impact of hepatic steatosis on liver stiffness in type-2 diabetic patients.

Methods: 142 type-2 diabetic patients, without liver disease history and who had been screened for fibrosis with FibroTest were reinvestigated using FibroTest and transient elastography after a 7-year median period. Patients with minor fibrosis (FibroTest < 0.48; F0/F1 METAVIR) at baseline and without progression during follow-up were included. Exclusion criteria were the presence of advanced fibrosis (FibroTest $\geq$ 0.48; F2/F3/F4) or necro-inflammatory activity (ActiTest $\geq$ 0.17; A1/A2/A3) at the reinvestigation. Patients with minor fibrosis on FibroTest but with advanced fibrosis on transient elastography ($\geq$ 7.1 kPa) were considered as LSM overestimation. Severe steatosis (>32% hepatocytes) was defined as SteatoTest $\geq$ 0.69, Fatty Liver Index (FLI) $\geq$ 60, Hepatic Steatosis Index (HSI) $\geq$ 36 or Controlled Attenuated Parameter (CAP) $\geq$ 283 dB/m.

Results: 102 patients were pre-included [55% male, 62 years, BMI 27.6 Kg/m²; ALT 23 U/L, 35% insulin and 53% statin treated]. After exclusion of non-applicable LSM by both M and XL probes (7%), 95 patients were analyzed. Patients with supposed liver stiffness overestimation (26%) versus those without had higher median BMI [32.0 vs. 26.6 Kg/m²]; waist circumference [109 vs. 100 cm]; thoracic fold [24.4 vs. 18.8 mm]; SteatoTest [0.64 vs. 0.48]; FLI [92 vs. 60]; and HSI [46 vs. 38]; all $P < 0.001$. In multivariate analysis [OR (95% CI)], severe steatosis as per SteatoTest [5.2 (1.5-22.6); $P = 0.01$], FLI [5.8 (1.2-23.6); $P = 0.03$], HSI [6.4 (1.2-35.0); $P = 0.03$] or CAP [7.9 (1.4-45.0); $P = 0.02$] were associated with supposed LSM overestimation.

Conclusion: The presence of hepatic steatosis might impact on liver stiffness leading to an overestimation of liver fibrosis by transient elastography.

Key words: transient elastography; type 2 diabetes; diagnosis

Introduction

Transient elastography based on liver stiffness measurement (LSM) is a validated non-invasive method to assess hepatic fibrosis (1). In this method, a probe is used to transmit a shear wave, and pulse-echo ultrasound acquisition is done to follow its propagation and measure its velocity, which is directly correlated to liver stiffness: the stiffer is the tissue, faster the shear wave propagates (2). It has been well established that necro-inflammatory activity (3, 4), extra-hepatic cholestasis (5) and heart failure (6) may influence liver stiffness measurement, leading to an overestimation of liver fibrosis.

FibroTest, ActiTest and SteatoTest are validated biomarkers to estimate liver fibrosis, necro-inflammatory activity and steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease, respectively (7). In addition, Fatty Liver Index (FLI) (8), Hepatic Steatosis Index (HSI) (9) and Controlled Attenuated Parameter measurements (CAP) (10) are validated non-invasive markers to assess liver steatosis

Few studies have been showing increased liver stiffness with higher levels of steatosis(11-13). Using concordance analysis methods, we previously observed that non-alcoholic fatty liver disease and steatosis were associated with an increase in liver stiffness measurement, even after hepatic necro-inflammatory activity and age were taken into account. In addition, the effect of steatosis on LSM was similar whether steatosis had been assessed by biopsy, SteatoTest or ActiTest.(14).

To confirm these observations we analyzed the impact of steatosis in a longitudinal study of type-2 diabetic patients with repeated FibroTest and SteatoTest. The primary aim was to evaluate the influence of liver steatosis, as estimated by non-invasive markers, on liver stiffness measurement.

Material and Methods

Study design

A cross-sectional study was conducted at the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. Patients with type 2 diabetes and repeated liver disease evaluations as per non-invasive markers (n=142) were eligible to participate. The inclusion criteria were the presence of minimal fibrosis (FibroTest <0.48; METAVIR F0F1) at the beginning of the follow-up, without progression to advanced fibrosis (FibroTest ≥0.48; F2F3F4), as estimated by repeated FibroTest evaluations. The exclusion criteria were: any cause of liver disease other than non-alcoholic fatty liver disease; the presence of necro-inflammatory activity (ActiTest ≥0.17; A1A2A3) as estimated by ActiTest; and missing data. The study protocol was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, and was approved by the local Ethics Committee. All patients signed the informed consent upon enrollment in the study.

Metabolic factors

Clinical records included the measurements of body mass index (BMI), waist circumference, blood pressure, and information on treatment, alcohol consumption and smoking. Central obesity was defined as a BMI >30 Kg/m², or waist circumference ≥ 88 cm in women or ≥ 102 cm in men. The metabolic syndrome was based on the International Diabetes Federation criteria (15). Thoracic fold measurements were done using a convex ultrasound probe and were defined as the distance between the probe and the hepatic capsule at the intercostal space where liver stiffness was measured.

Liver fibrosis

Liver fibrosis was evaluated by FibroTest (BioPredictive Paris, France; FibroSURE LabCorp Burlington, NC, USA) and transient elastography based on liver stiffness measurement by Fibroscan (EchoSens, Paris, France). FibroTest includes serum concentrations of α₂-macroglobulin, apolipoprotein-A1, haptoglobin, total bilirubin, and

gamma-glutamyl transferase (GGT), adjusted for age and gender. FibroTest was the reference for fibrosis estimation, and advanced fibrosis (F2F3F4 according to METAVIR histological score) (16) was defined as FibroTest ≥ 0.48 (17). Necro-inflammatory activity was estimated by ActiTest, a biomarker that includes the same five components of FibroTest plus alanine transaminase (ALT). The presence of necro-inflammatory activity was defined as ActiTest ≥ 0.17 . Liver stiffness measurement, which was performed in fasting patients as previously described (2), was considered reliable when the following criteria had been met: (i) 10 successful measurements; (ii) an interquartile range lower than 30% of the median value; and (iii) a success rate of more than 60% (14, 18). Liver stiffness was considered the median of all valid measurements. Non-applicable liver stiffness measurement was defined as either the presence of valid measurements that did not meet the above-described criteria, an unreliable test or total absence of valid measurements, a failure test. The M probe was considered the standard for liver stiffness measurement analysis. However, in case of non-applicability of the M probe, liver stiffness measured by the XL probe was used for analysis. Advanced fibrosis (F2F3F4) as per transient elastography was considered whether LSM ≥ 7.1 kPa (19).

Liver Steatosis

Liver steatosis was estimated by SteatoTest (BioPredictive Paris, France; NASH-FibroSURE, LabCorp, Burlington, NC, USA) (20), FLI (8), HSI (9) and CAP (EchoSens, Paris, France) (10).

SteatoTest includes the components of FibroTest, plus serum concentrations of ALT, fasting glucose, triglycerides and cholesterol, which are adjusted for age, gender and BMI. This biomarker was calculated in a secure informatics algorithm, and the recommended pre-analytical and analytical procedures were used (21). FLI includes BMI, waist circumference, triglycerides and GGT; HSI used transaminases, BMI and the presence of type 2 diabetes adjusted for gender. Both markers were calculated according the following formulas:

$$FLI = \frac{(e^{0.953 \cdot \ln(\text{triglycerides, mg/dl}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \ln(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \ln(\text{waist circumference}) - 15.745})}{1 + (e^{0.953 \cdot \ln(\text{triglycerides, mg/dl}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \ln(\text{GGT}) + 0.053 \cdot \ln(\text{waist circumference}) - 15.745})} \times 100$$

HSI = 8 x ALT/AST ratio + BMI + 2 (if diabetes) + 2 (if female).

CAP measurements, performed as described previously (22), were assessed using the M probe simultaneously and in the same volume of liver parenchyma as the liver stiffness measurement. The final CAP was the median of the valid measurements, and the applicability criteria for the test were the same as with transient elastography.

The presence of steatosis (>32% hepatocytes) was defined as SteatoTest ≥ 0.69 (20), FLI ≥ 60 (8), HSI ≥ 36 (9) or CAP ≥ 283 dB/m (10).

Follow-up and overestimation of liver stiffness

Type-2 diabetic patients (n=142) who had been previously screened for liver fibrosis with FibroTest were prospectively followed for a median time of 7 (6-8) years. Patients were re-evaluated with non-invasive markers of liver fibrosis (FibroTest and transient elastography) and steatosis (SteatoTest, FLI, HSI and CAP) at the end-of-follow-up. In order to analyze only those patients who did not have progression of minor fibrosis (FibroTest < 0.48; F0F1) during the 7-year follow-up, individuals that presented with advanced fibrosis at baseline and those that had progressed from minor fibrosis to advanced fibrosis as per repeated FibroTest during follow-up were excluded. Furthermore, patients with ActiTest ≥ 0.17 (A1A2A3) at the end-of-follow-up were also excluded in order to eliminate the influence of hepatic necro-inflammatory activity on liver stiffness (Figure 1).

Patients with minor fibrosis (FibroTest < 0.48; F0F1) on repeated FibroTest over a 7-year period (ordinary follow-up) but with advanced fibrosis on transient elastography (liver stiffness measurement ≥ 7.1 kPa; F2F3F4) were considered to have overestimation of liver stiffness.

Statistical analysis

Continuous variables were reported as median (range), and discrete variables as absolute and relative frequency. Non-parametric tests, including the Fisher's exact test for qualitative and the Mann-Whitney test for quantitative comparisons, were used. The odds ratio (OR), together with its 95% confidence interval (95% CI) and the corresponding *p* value was calculated for assessment of relative risks using logistic regression. The multivariate models were adjusted for confounding factors such as age, gender, hepatic necro-inflammatory activity and metabolic factors. In the multivariate analysis, steatosis was estimated by SteatoTest in model 1, FLI in model 2, HSI in model 3 and CAP in model 4. The Spearman's test was used to correlate non-invasive biomarkers of steatosis. The significance level was determined when *P* was ≤ 0.05 , assuming two-tailed tests. Analysis was performed using Number Cruncher Statistical Systems 2008 (NCSS, Kaysville, UT, USA) and STATA (2012; StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Results

Of the 142 eligible type-2 diabetic patients, a total of 102 patients without progressive minor fibrosis as estimated by FibroTest in the last 7 years were included (55% male, median age 62 years and BMI 27.6 Kg/m²; 35% insulin-treated and 53% using statins). Thirty-eight patients had a non-applicable liver stiffness measurement using the M probe (23 patients with failure, and 15 patients with unreliable test). Finally, a total of 95 patients had an applicable liver stiffness measurement using the M or XL probes (Figure 1).

In univariate analysis, the presence of steatosis as presumed by the non-invasive biomarkers, and the presence of metabolic factors were associated with non-applicability of liver stiffness measurement using the M probe (Table 1). Central obesity and thoracic fold > 20 mm remained independent factors associated with non-applicability of the M probe in a multivariate model adjusted for age, gender, metabolic factors and the presence of steatosis and necro-inflammatory activity (Table 2). In patients with applicable liver stiffness

measurement using both probes (n=62), the M probe provided higher median results than the XL probe [5.9 (3.2-13.6) vs. 5.3 (3.1-19.6) kPa; $P=0.02$]. Sixty-one (60%) patients had an applicable CAP measurement, and factors determining CAP applicability were the same for liver stiffness measurement (Supplementary Tables S1 and S2).

In patients with an applicable LSM using the M or XL probe (n=95), those with supposed liver stiffness overestimation (n=25) compared with those without were younger (57 vs. 66 years; $p<0.01$), had higher transaminase (ALT 30 vs. 23, $P=0.01$; AST 26 vs. 22 U/L, $P=0.04$) and GGT levels (42 vs. 28 U/L; $P=0.01$), and had higher BMI (32.0 vs. 26.6 Kg/m²; $P<0.001$), waist circumference (109 vs. 100 cm; $P<0.001$) and thoracic fold measurements (24.4 vs. 18.8 mm; $P<0.001$). Furthermore, patients with supposed liver stiffness overestimation presented higher rates of severe steatosis per SteatoTest (44% vs. 11%; $P<0.001$), FLI (80% vs. 50%; $P<0.01$), HSI (88% vs. 61%; $P=0.02$) and CAP (40% vs. 15%; $P=0.04$) (Table 3). SteatoTest, FLI and HSI were also significantly higher in patients with supposed overestimation of liver stiffness measurement (Figure 2). Non-invasive markers of steatosis were highly correlated (Supplementary Table S3). The presence of severe steatosis as estimated by non-invasive markers was independently associated with an overestimation of liver stiffness in multivariate models adjusted for age, gender, necro-inflammatory activity and metabolic factors (Table 4).

Discussion

This study showed that the presence of steatosis as estimated by different non-invasive markers in type 2 diabetic patients leads to an overestimation of hepatic fibrosis based on liver stiffness measurements, independent of confounding factors.

The presence of hepatic necrosis/inflammation is one of the main factors associated with supposed overestimation (or false-positive) of liver stiffness measurement in chronic liver diseases. Fung *et al.* reported a high correlation between transaminase levels and liver

stiffness in patients with chronic viral hepatitis B (3, 4). Similar results were also observed by Vispo *et al.* in patients with chronic hepatitis C virus (23). Therefore in order to reduce this confounding activity factor, we excluded patients with hepatic necrosis/inflammation as estimated by ActiTest (≥ 0.17 ; A1A2A3). Patients had normal median levels of ALT, AST and GGT, and only a few had transaminase levels $> 1.5\times$ upper limit of normal (ULN). Even in this highly selected population, patients with supposed overestimation of liver stiffness measurement presented higher ALT (30 vs. 23 U/L; $P=0.01$), AST (26 vs. 22 U/L; $P=0.04$) and GGT levels (42 vs. 28 U/L; $P=0.01$). This suggested that steatosis is likely to be the main factor of this transaminase elevation. However, our multivariate models were also adjusted for the presence of minimal hepatic activity, as expressed by ALT and GGT levels, to eliminate a possible influence of hepatic inflammatory activity on liver stiffness measurement.

Extra-hepatic cholestasis and vascular hepatic congestion increase liver stiffness independent of fibrosis status. In extra-hepatic cholestasis, some authors have reported that liver stiffness measurement significantly correlates with bilirubin levels and decreases after successful biliary drainage (5). Furthermore, previous studies reported the impact of decompensated heart failure in LSM (6). In our study, patients had presented normal bilirubin levels and no clinical signals of cholestasis or heart failure.

It could be argued that FibroTest underestimated liver fibrosis rather than an overestimation as per transient elastography. Haptoglobin and apolipoprotein-A1 levels in the upper limit and alpha-2 macroglobulin in the lower limit of normal (LLN) are rare but are still the main factors related to a false-negative of FibroTest (24). Haptoglobin (1.56 vs. 1.49 g/L; $P=0.87$), apolipoprotein-A1 (1.45 vs. 1.50 g/L; $P=0.20$) and alpha-2 macroglobulin levels (1.72 vs. 1.75 g/L; $P=0.93$) were similar in supposed liver stiffness measurement overestimation compared to those without. Only four (4%) patients presented with haptoglobin in the ULN (≥ 3.20 g/L), and no patients had apolipoprotein-A1 in the ULN (≥ 2.50

g/L) or alpha-2 macroglobulin in the LLN (≤ 0.80 g/L). Analysis results were similar after the exclusion of patients with extreme haptoglobin values. None of our patients were on antibiotic treatment for systemic infections, which is a potential cause of high haptoglobin levels. None of them presented with ascites or starvation, which are causes of low alpha-2 macroglobulin levels [20]. In addition, the recommended pre-analytical and analytical procedures and security algorithms were applied (21). All FibroTests were applicable without warnings, i.e. an indication of an outlier parameter that might lead to a false positive or negative result.

The demonstration that steatosis as estimated by four different validated non-invasive markers could influence liver stiffness reinforced our primary hypothesis. Our results confirmed the recently data by Boursier *et al* that showed the impact of steatosis on LSM using liver biopsy as reference (13). These authors reported up to 30% of misclassification of patients with minor fibrosis as $F \geq 2$ by transient elastography in presence of hepatic steatosis. We are aware that the biomarkers SteatoTest, FLI and HSI present common parameters and were highly correlated. However, these biomarkers present distinct calculation formulas and cut-offs. In addition, steatosis as estimated by a marker based on shear wave propagation, such as CAP, was also related to an increase in liver stiffness. The CAP measurement was non-applicable in 40% of patients, because this measurement is not present in the XL probe. Despite this limitation and the resulting loss of statistical power, steatosis as estimated by this marker remained associated with liver fibrosis overestimation by transient elastography after adjusting for confounding factors. Clinicians should be aware of the risk of overestimation of fibrosis by LSM in presence of hepatic steatosis. In clinical practice, non-invasive markers, such as SteatoTest, FLI, HSI or CAP should be used to presume steatosis and avoid misclassification of patients by LSM.

In the present study, we confirmed the factors related to non-applicability of liver stiffness measurement by the M probe as previously reported (14, 25). De Lédinghen *et al*.

reported 18% non-applicability using the M probe, with 8% of failure examinations, in 338 diabetic patients, the majority male, half with type 1 diabetes and 10% with BMI >30Kg/m² (26). We described higher rates of non-applicability (37%) of the M probe, especially for test failures (22%). However, our sample was composed exclusively of type-2 diabetic patients, mostly female and with one-third presenting with BMI >30Kg/m². In our study, the presence of steatosis as estimated by biomarkers was not associated with non-applicability of the M probe in a multivariate model. In addition, similar factors related to non-applicable liver stiffness measurement were described for the CAP measurement. As previously described, the XL probe was able to “rescue” most patients with non-applicable M probe test and provided lower liver stiffness measurements than the M probe (27, 28).

The limitations of our study are the absence of liver biopsy as a gold standard for the estimation of hepatic lesions and the small patient population. However, our sample was composed of type-2 diabetic patients with normal liver function tests, in whom performing liver biopsy might be considered unethical. FibroTest is a validated biomarker for staging liver fibrosis in patients at high risk of non-alcoholic fatty liver disease (7) and has low rates of false-positive/negative results (24). This biomarker was calculated in a secured algorithm (21), and no tests presented warnings for false results. For liver steatosis, we used four different validated markers that were replaced in the multivariate model, which was adjusted for the same confounding factors to evaluate the influence of steatosis on liver stiffness measurement overestimation. In addition, we aimed to evaluate patients with proven minor fibrosis to improve transient elastography performance. As a result we included only patients with no progressive fibrosis in the long-term follow-up, thus restricting our sample.

The main strengths of the study are the experience of the transient elastography operator and the inclusion of patients with long-term minor fibrosis (F0F1) and without hepatic necro-inflammatory activity. Transient elastography was performed in fasting patients

by the same experienced operator (>1000 exams), thus minimizing the influence of food intake (29) and operator effect (25) on liver stiffness. We only included patients that had no progression of liver fibrosis over a median 7-year period in order to have a sample with stable minor fibrosis. As expected, none of the patients developed liver-related complications during follow-up, such as ascites, esophageal varices bleeding or hepatic encephalopathy. In addition, patients with necro-inflammatory activity as per ActiTest (30) were excluded, and the multivariate model was adjusted for the presence of transaminases or GGT >1.5x ULN in order to minimize the influence of hepatic inflammation on LSM.

In conclusion, this study suggests that the presence of hepatic steatosis might have an impact on liver stiffness, leading to an overestimation of liver fibrosis on transient elastography. Further studies with a representative sample of patients with liver biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease are necessary to validate this hypothesis.

References

1. De Ledingham V, Vergniol J. Transient elastography (FibroScan). *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 58-67.
2. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol* 2008; 48: 835-47.
3. Fung J, Lai CL, Chan SC, et al. 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* 2010; 105: 1116-22.
4. Fung J, Lai CL, Cheng C, Wu R, Wong DK, Yuen MF. Mild-to-moderate elevation of alanine aminotransferase increases liver stiffness measurement by transient elastography in patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 492-6.

5. Millonig G, Reimann FM, Friedrich S, et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48: 1718-23.
6. Colli A, Pozzoni P, Berzuini A, et al. Decompensated chronic heart failure: increased liver stiffness measured by means of transient elastography. *Radiology* 2010; 257: 872-8.
7. Poynard T, Lassailly G, Diaz E, et al. Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS One* 2012; 7: e30325.
8. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33.
9. Lee JH, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 503-8.
10. Myers RP, Pollett A, Kirsch R, et al. Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography. *Liver Int* 2012; 32: 902-10.
11. Ziol M, Kettaneh A, Ganne-Carrie N, Barget N, Tenger-Barna I, Beaugrand M. Relationships between fibrosis amounts assessed by morphometry and liver stiffness measurements in chronic hepatitis or steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 1261-8.
12. Sanchez-Conde M, Montes Ramirez ML, Bellon Cano JM, et al. Impact of liver steatosis on the correlation between liver stiffness and fibrosis measured by transient elastography in patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2011; 18: e278-83.

13. Boursier J, De Ledinghen V, Sturm N, et al. Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013. DOI 10.1007/s
14. Poynard T, Ingliz P, Elkrif 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.
15. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23: 469-80.
16. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994; 20(1 Pt 1): 15-20.
17. Halfon P, Munteanu M, Poynard T. FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 22-39.
18. Castera L, Goutte N, Tubach F, Bedossa P, Degos F. 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* 2012; 56: 224A-24A.
19. 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: 343-50.
20. Poynard T, Ratziu V, Naveau S, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 2005; 4: 10.

21. Poynard T, Munteanu M, Morra R, et al. Methodological aspects of the interpretation of non-invasive biomarkers of liver fibrosis: a 2008 update. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 8-21.
22. Sasso M, Beaugrand M, De Ledinghen V, et al. 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* 2010; 36: 1825-35.
23. Vispo E, Barreiro P, Del Valle J, et al. Overestimation of liver fibrosis staging using transient elastography in patients with chronic hepatitis C and significant liver inflammation. *Antivir Ther* 2009; 14: 187-93.
24. Poynard T, Munteanu M, Deckmyn O, et al. Applicability and precautions of use of liver injury biomarker FibroTest. A reappraisal at 7 years of age. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 39.
25. 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: 828-35.
26. De Ledinghen V, Vergniol J, Gonzalez C, et al. Screening for liver fibrosis by using FibroScan((R)) and FibroTest in patients with diabetes. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 413-8.
27. De Ledinghen V, Vergniol J, Foucher J, El-Hajbi F, Merrouche W, Rigalleau V. Feasibility of liver transient elastography with FibroScan using a new probe for obese patients. *Liver Int* 2010; 30: 1043-8.
28. De Ledinghen V, Wong VW, Vergniol J, et al. Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement: Comparison between M and XL probe of FibroScan(R). *J Hepatol* 2012; 56: 833-9.

29. Arena U, Lupson 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.
30. Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, et al. Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 499-506.

Figures Legends

Figure 1. Study flowchart

Figure 2. Hepatic steatosis estimated as non-invasive markers, SteatoTest (A), Fatty Liver Index (B), Hepatic Steatosis Index (C) and Controlled Attenuated Parameter (D), according to presence of supposed overestimation of liver stiffness measurement (≥ 7.1 kPa) by transient elastography.

Table 1. Patients' characteristics according to liver stiffness measurement applicability by the M probe

	All (n=102)	Applicable LSM (n=64)	Non-applicable LSM (n=38)	P value
Male gender	56 (55)	37 (58)	19 (50)	0.44
Age, years	62 (42-84)	63 (43-84)	62 (42-79)	0.44
Alcohol consumption, g/day	0 (0-40)	0 (0-40)	0 (0-20)	0.28
Liver function tests				
ALT, U/L	23 (10-59)	23 (12-45)	23 (10-59)	0.87
AST, U/L	23 (14-53)	23 (16-48)	23 (12-53)	0.59
Transaminases > 1.5xULN	8 (7.8)	4 (6.3)	4 (10.5)	0.47
GGT, U/L	32 (12-135)	29 (12-122)	34 (5-135)	0.58
GGT > 1.5xULN	8 (7.9)	5 (7.8)	3 (7.9)	0.99
Total bilirubin, mmol/L	7 (3-30)	7 (3-30)	6 (3-14)	0.40
Markers of steatosis				
SteatoTest	0.52 (0.09-0.90)	0.48 (0.07-0.90)	0.57 (0.19-0.90)	0.03
SteatoTest ≥ 0.69	20 (19.6)	9 (14.1)	11 (29.0)	0.07
Fatty Liver Index	65.3 (0.4-99.9)	53.9 (0.4-98.8)	80.9 (3.0-99.9)	<0.001
Fatty Liver Index ≥ 60	58 (57)	29 (45)	29 (76)	0.002
Hepatic Steatosis Index	38.8 (29.8-62.4)	37.6 (28.5-55.7)	44.5 (31.2-62.4)	<0.001
Hepatic Steatosis Index ≥ 36	70 (69)	37 (58)	33 (87)	0.002
Metabolic factors				
Systolic blood pressure, mmHg	133 (90-183)	130 (90-183)	137 (107-176)	0.59
Diastolic blood pressure, mmHg	75 (52-101)	76 (53-101)	74 (52-92)	0.08
Fasting glucose, mmol/L	7.5 (3.4-16.4)	7.5 (3.4-16.4)	8.2 (3.2-14.1)	0.37
Triglycerides, mmol/L	1.3 (0.4-9.8)	1.2 (0.4-9.8)	1.3 (0.6-3.8)	0.42
Total cholesterol, mmol/L	4.2 (2.8-7.4)	4.3 (2.7-7.4)	4.2 (2.8-6.5)	0.91
Insulin treatment	36 (35)	20 (31)	16 (42)	0.27
Statin treatment	54 (53)	33 (52)	21 (55)	0.72
Antiplatelet treatment	30 (29)	15 (23)	15 (39)	0.08
BMI, kg/m ²	27.6 (20.5-52.8)	26.1 (19.6-45.3)	33.5 (21.7-52.8)	<0.001
BMI > 30 kg/m ²	38 (37)	25 (66)	13 (20)	<0.001
Waist circumference, cm	101 (62-150)	100 (78-132)	112 (62-150)	<0.001
Waist circumference ≥ 88 cm in women or ≥ 102 cm in men	62 (64)	30 (51)	32 (84)	<0.001
Thoracic fold, mm	20.3 (1.4-51.4)	18.5 (1.4-30)	23.2 (1.4-51.4)	<0.01
Thoracic fold > 20 mm	51 (52)	24 (38)	27 (77)	<0.001
Hypertension	67 (66)	42 (66)	25 (65)	0.98
Dyslipidemia	71 (70)	43 (67)	28 (74)	0.49
Current smoking	15 (14)	13 (20)	2 (5)	0.04

Data expressed as median (range) or absolute (%). Comparisons were assessed by Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. LSM, liver stiffness measurement; ALT,

alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ULN, upper limit of normal; GGT, gamma-glutamyltransferase; BMI, body mass index

Table 2. Risk factors associated with non-applicability of liver stiffness measurement (LSM) by the M probe in a logistic regression multivariate model

Non-invasive marker of steatosis	Model 1 SteatoTest ≥ 0.69			Model 2 FLI ≥ 60			Model 3 HSI ≥ 36		
	OR	95%IC	P value	OR	95%IC	P value	OR	95%IC	P value
Male gender	1.10	0.36-3.36	0.87	1.13	0.37-3.43	0.84	1.31	0.42-4.09	0.64
Age>60 years	1.52	0.50-4.62	0.74	1.47	0.49-4.41	0.49	1.66	0.55-4.99	0.37
Transaminases >1.5xULN	0.83	0.14-4.77	0.83	0.87	0.15-4.89	0.87	0.95	0.17-5.23	0.95
GGT > 1.5xULN	1.64	0.24-11.36	0.62	1.68	0.25-11.29	0.60	1.75	0.25-12.23	0.57
Steatosis as per the non-invasive marker	1.19	0.32-4.49	0.80	0.99	0.26-3.82	0.99	2.84	0.67-12.03	0.16
Thoracic fold > 20mm	3.48	1.20-10.13	0.02	3.57	1.14-11.20	0.03	3.22	1.11-9.34	0.03
Central obesity	4.64	1.27-16.94	0.02	4.86	1.13-21.00	0.03	3.37	0.89-12.70	0.07
Hypertension	1.00	0.33-3.05	0.99	0.98	0.32-2.98	0.97	0.83	0.26-2.61	0.75
Dyslipidemia	1.57	0.47-5.22	0.47	1.63	0.51-5.25	0.41	1.70	0.52-5.55	0.38

N=102. FLI, Fatty Liver Index; HSI, Hepatic Steatosis Index; OR, odds ratio; CI, confidence interval; GGT, gamma-glutamyl transferase; ULN, upper limit of normal

Table 3. Patients' characteristics according to presence of supposed liver stiffness measurement overestimation

	No supposed LSM overestimation (<7.1 kPa) (n=70)	Supposed LSM overestimation (≥7.1 kPa) (n=25)	P value
Male gender	36 (51)	15 (60)	0.49
Age, years	66 (43-84)	57 (46-78)	0.002
Alcohol consumption, g/day	0 (0-40)	3 (0-20)	0.49
Liver function tests			
ALT, U/L	23 (10-43)	30 (10-59)	0.01
AST, U/L	22 (14-48)	26 (12-53)	0.04
Transaminases > 1.5xULN	4 (5.7)	3 (12.0)	0.38
GGT, U/L	28 (12-117)	42 (5-135)	0.01
GGT > 1.5xULN	3 (4.3)	5 (20.0)	0.03
Total bilirubin, mmol/L	7 (3-30)	6 (3-21)	0.04
Biomarkers of steatosis			
SteatoTest	0.48 (0.07-0.90)	0.64 (0.28-0.90)	<0.001
SteatoTest ≥ 0.69	8 (11.4)	11 (44.0)	<0.001
Fatty Liver Index	59.6 (0.5-96.6)	92.1 (0.4-99.9)	<0.001
Fatty Liver Index ≥ 60	35 (50.0)	20 (80.0)	<0.01
Hepatic Steatosis Index	38.2 (28.5-53.6)	45.9 (30.2-62.2)	<0.001
Hepatic Steatosis Index ≥ 36	43 (61.4)	22 (88.0)	0.02
Metabolic factors			
Systolic blood pressure, mmHg	133 (90-183)	131 (110-160)	0.95
Diastolic blood pressure, mmHg	75 (52-101)	78 (62-93)	0.17
Fasting glucose, mmol/L	7.5 (3.2-14.4)	8.2 (4.1-16.4)	0.36
Triglycerides, mmol/L	1.1 (0.4-9.8)	1.4 (0.6-4.5)	0.01
Total cholesterol, mmol/L	4.3 (2.7-7.4)	4.1 (2.8-6.0)	0.38
BMI, kg/m ²	26.6 (19.6-39.9)	32.0 (21.3-49.5)	<0.001
BMI > 30 kg/m ²	19 (27)	17 (68)	<0.001
Waist circumference, cm	100 (78-127)	109 (79-150)	<0.001
Waist circumference ≥88 cm in women or ≥102cm in men	40 (60)	19 (83)	<0.05
Thoracic fold, mm	18.8 (1.4-30.3)	24.4 (1.4-51.4)	<0.001
Thoracic fold > 20mm	30 (43)	17 (68)	0.03
Hypertension	47 (67)	15 (60)	0.52
Dyslipidemia	52 (74)	16 (64)	0.33
Current smoking	12 (17)	3 (12)	0.75

Data expressed as median (range) or absolute (%). Comparisons were assessed by Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. LSM, liver stiffness measurement; kPa, kilopascals; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ULN, upper limit of normal; GGT, gamma-glutamyltransferase; BMI, body mass index

Table 4. Risk factors associated with supposed overestimation of liver stiffness measurement
in a logistic regression multivariate model

Non-invasive steatosis marker	Model 1 <u>SteatoTest ≥ 0.69 (a)</u>			Model 2 <u>FLI ≥ 60 (a)</u>			Model 3 <u>HSI ≥ 36 (a)</u>			Model 4 <u>CAP ≥ 283 (b)</u>		
	OR	95%CI	P value	OR	95%CI	P value	OR	95%CI	P value	OR	95%CI	P value
Male gender	3.79	0.93-15.48	0.06	4.62	1.13-18.84	0.03	6.01	1.52-23.84	0.01	7.83	0.89-69.14	0.06
Age>60 years	0.32	0.92-1.13	0.08	0.24	0.07-0.86	0.03	0.30	0.09-1.03	0.06	0.10	0.02-0.62	0.01
Transaminases > 1.5xULN	2.42	0.28-20.95	0.42	6.10	0.67-56.78	0.11	4.40	0.58-33.38	0.15	8.55	0.37-195.65	0.18
GGT > 1.5xULN	3.10	0.46-20.83	0.25	3.94	0.60-25.93	0.15	4.50	0.71-28.53	0.11	1.11	0.93-13.39	0.93
Steatosis as per the non-invasive marker	5.75	1.46-22.64	0.01	5.24	1.16-23.59	0.03	6.42	1.18-35.01	0.03	7.90	1.39-45.04	0.02
Central obesity	2.86	0.71-11.57	0.14	1.75	0.37-8.28	0.48	2.39	0.56-10.20	0.24	2.55	0.35-18.36	0.35
Hypertension	1.53	0.44-5.26	0.50	1.45	0.41-5.18	0.56	1.05	0.31-3.61	0.93	1.05	0.18-6.29	0.96
Dyslipidemia	0.24	0.06-0.93	0.04	0.31	0.08-1.20	0.09	0.43	0.12-1.52	0.19	0.22	0.04-1.37	0.11

(a) n=95; (b) n=61. FLI, Fatty Liver Index; HSI, Hepatic Steatosis Index; CAP, Controlled Attenuated Parameter; OR, odds ratio; CI, confidence interval; GGT, gamma-glutamyl transferase; ULN, upper limit of normal

Figure 1.

Figure 1.

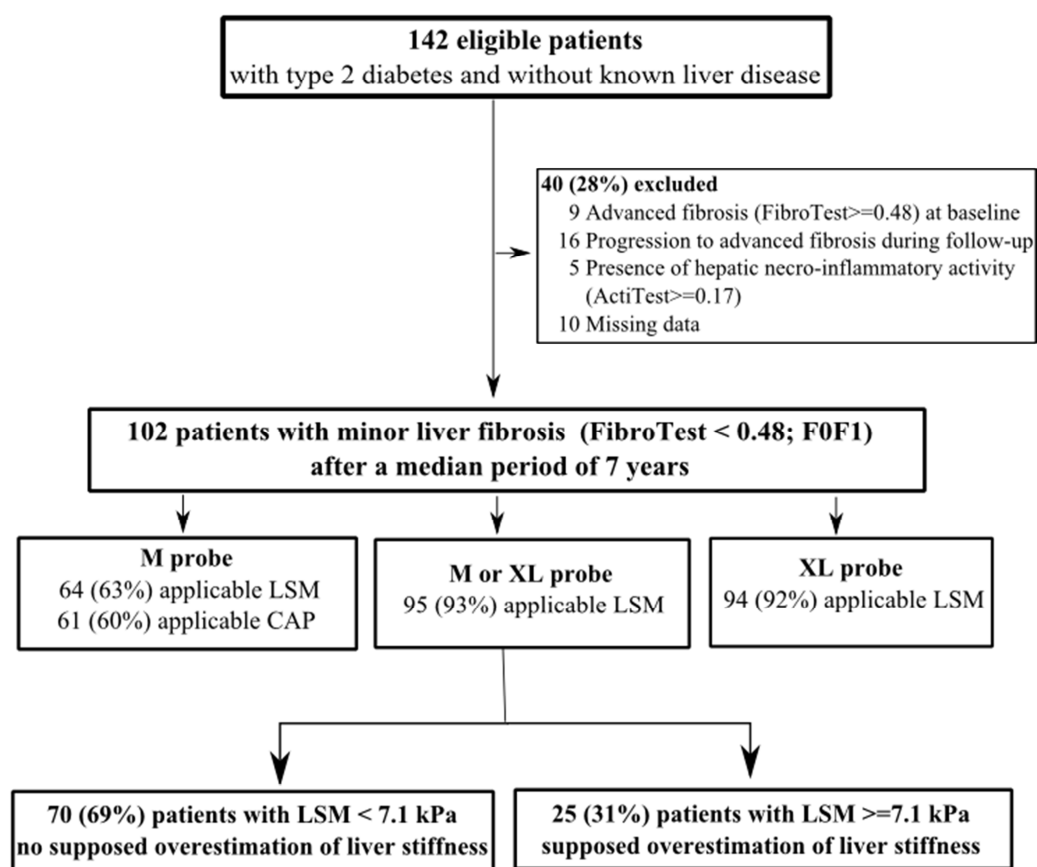
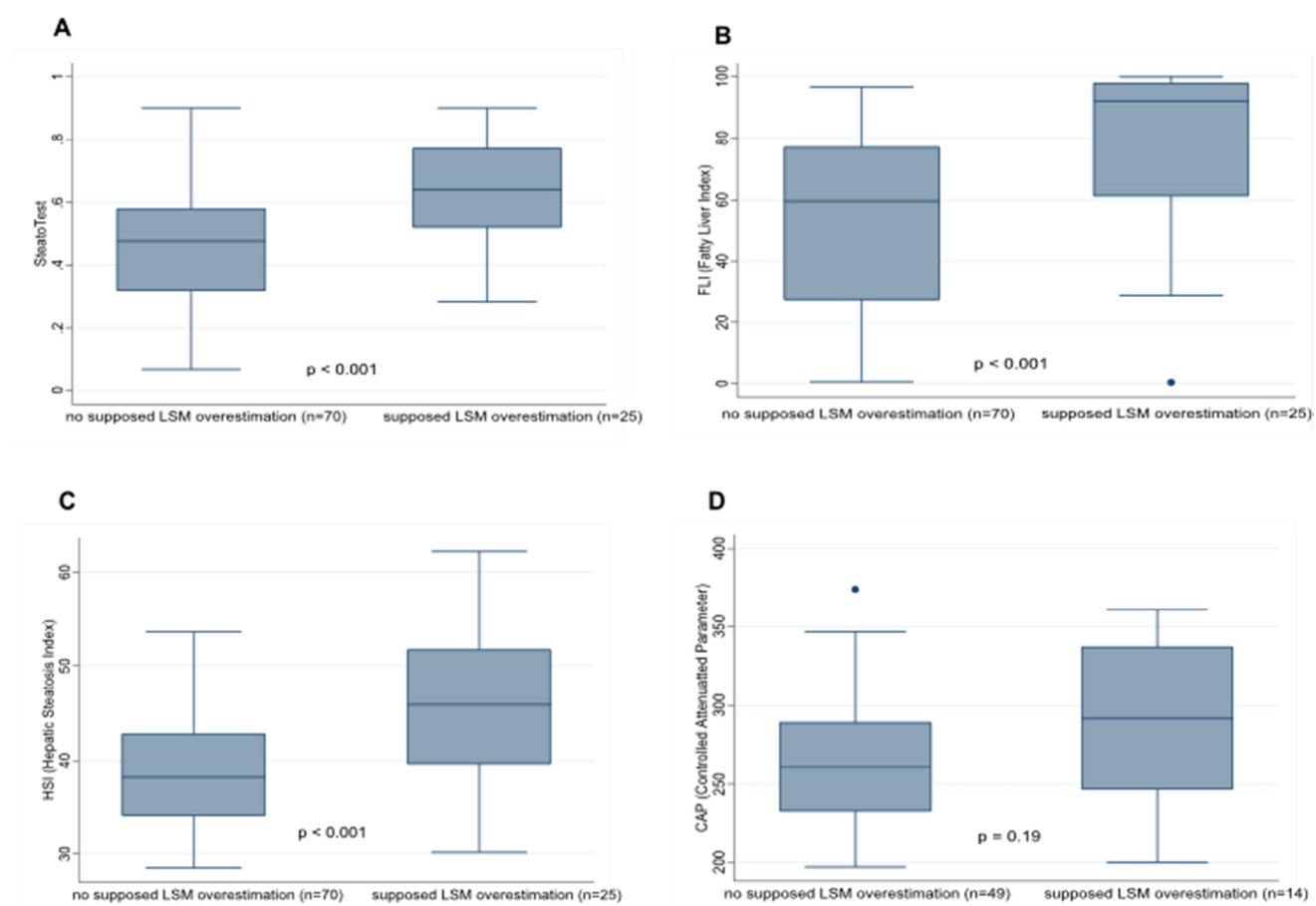


Figure 2.

Figure 2



Supplementary Tables

Supplement to: Hepatic steatosis per non-invasive biomarkers leads to an overestimation of fibrosis based on liver stiffness measurement in type 2 diabetic patients

Short title: Steatosis overestimates liver stiffness

Author Names:

Hugo Perazzo, Mona Munteanu, Yen Ngo, Pascal Lebray, Elena Lukina, Noemi Seurat, Fanny Rutka, Marion Couteau, Sophie Jacqueminet, Denis Monneret, Françoise Imbert-Bismut, Vlad Ratzu, Agnes Hartemann-Huertier, Chantal Housset and Thierry Poynard for the FLIP Consortium

Corresponding Author: Thierry Poynard, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France; tpoynard@teaser.fr; Tel: +33 1 42 16 10 22; Fax: + 33 1 42 16 14 27.

Supplementary Table S1. Patients' characteristics according to controlled attenuated parameter (CAP) applicability

	Applicable CAP (n=61)	Non-applicable CAP (n=41)	P value
Male gender	36 (59)	20 (49)	0.31
Age, years	64 (43-84)	62 (42-74)	0.45
Alcohol consumption, g/day	0 (0-40)	0 (0-30)	0.46
Liver function tests			
ALT, U/L	24 (12-45)	22 (10-59)	0.45
AST, U/L	24 (17-48)	22 (12-53)	0.33
Transaminases > 1.5xULN	4 (6.6)	4 (9.8)	0.56
GGT, U/L	29 (12-122)	33 (5-135)	0.88
GGT > 1.5xULN	5 (8.2)	3 (7.3)	0.87
Total bilirubin, mmol/L	7 (3-30)	6 (3-21)	0.16
Markers of steatosis			
SteatoTest	0.47 (0.07-0.90)	0.55 (0.12-0.90)	0.05
SteatoTest ≥ 0.69	9 (14.8)	11 (26.8)	0.13
Fatty Liver Index	53.9 (0.4-98.8)	80.5 (6.9-99.9)	<0.001
Fatty Liver Index ≥ 60	27 (44.3)	31 (75.6)	<0.01
Hepatic Steatosis Index	37.5 (28.5-55.7)	44.0 (30.1-62.4)	<0.001
Hepatic Steatosis Index ≥ 36	35 (57.4)	35 (85.4)	<0.01
Metabolic factors			
Systolic blood pressure, mmHg	131 (90-183)	136 (107-176)	0.76
Diastolic blood pressure, mmHg	76 (57-101)	73 (52-92)	0.11
Fasting glucose, mmol/L	7.5 (3.4-16.4)	7.8 (3.2-14.1)	0.54
Triglycerides, mmol/L	1.2 (0.4-9.8)	1.3 (0.4-3.8)	0.60
Total cholesterol, mmol/L	4.2 (2.7-7.4)	4.2 (2.8-6.5)	0.89
Insulin treatment	20 (33)	16 (39)	0.52
Statin treatment	32 (53)	22 (54)	0.91
Antiplatelet treatment	15 (25)	15 (37)	0.19
BMI, kg/m ²	26.0 (19.6-45.3)	33.1 (20.8-52.8)	<0.001
BMI > 30 kg/m ²	11 (18)	27 (66)	<0.001
Waist circumference, cm	100 (62-132)	110 (82-150)	<0.001
Waist circumference ≥88 cm in women or ≥102cm in men	28 (46)	34 (83)	0.001
Thoracic fold, mm	18.5 (1.4-30.0)	22.9 (1.4-51.4)	<0.01
Thoracic fold > 20mm	24 (41)	27 (69)	<0.01
Hypertension	38 (62)	29 (71)	0.38
Dyslipidemia	39 (64)	32 (78)	0.13
Current smoking	13 (21)	2 (5)	0.03

Data expressed as median (range) or absolute (%). Comparisons were assessed by Mann-Whitney test for quantitative and Fisher's exact test for qualitative variables. CAP, controlled attenuated parameter; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ULN, upper limit of normal; GGT, gamma-glutamyltransferase; BMI, body mass index

Supplementary Table S2. Risk factors associated with non-applicability of controlled attenuated parameter (CAP) in a logistic regression multivariate model

Non-invasive marker of steatosis	Model 1 SteatoTest ≥ 0.69			Model 2 FLI ≥ 60			Model 3 HSI ≥ 36		
	OR	95%IC	P value	OR	95%IC	P value	OR	95%IC	P value
Male gender	1.05	0.36-3.06	0.93	1.04	0.36-3.02	0.94	1.17	0.40-3.46	0.77
Age>60 years	1.39	0.49-3.97	0.53	1.40	0.50-3.96	0.52	1.46	0.52-4.13	0.48
Transaminases >1.5xULN	0.75	0.14-4.10	0.74	0.81	0.15-4.38	0.80	0.81	0.15-4.31	0.80
GGT > 1.5xULN	1.33	0.20-8.75	0.77	1.36	0.21-8.74	0.75	1.35	0.21-8.77	0.76
Presence of steatosis	1.12	0.30-4.20	0.87	1.23	0.35-4.33	0.75	1.85	0.50-6.85	0.36
Thoracic fold > 20mm	2.21	0.80-6.08	0.13	2.09	0.71-6.17	0.18	2.06	0.75-5.66	0.16
Central obesity	4.02	1.22-13.25	0.02	3.69	0.97-14.07	0.06	3.25	0.93-11.30	0.06
Hypertension	1.54	0.53-4.50	0.43	1.51	0.52-4.37	0.45	1.38	0.47-4.10	0.56
Dyslipidemia	1.94	0.62-6.12	0.26	1.96	0.64-5.99	0.24	2.03	0.67-6.18	0.21

FLI, Fatty Liver Index; HSI, Hepatic Steatosis Index; OR, odds ratio; CI, confidence interval; GGT, gamma-glutamyl transferase; ULN, upper limit of normal

Supplementary Table S3. Spearman's correlation (ρ) between non-invasive markers of steatosis

	SteatoTest	<i>P</i> value	FLI	<i>P</i> value	HSI	<i>P</i> value	CAP	<i>P</i> value
SteatoTest			0.75	<0.001	0.68	<0.001	0.39	<0.01
FLI	0.75	<0.001			0.81	<0.001	0.47	<0.001
HSI	0.68	<0.001	0.81	<0.001			0.33	<0.01
CAP	0.39	<0.01	0.47	<0.001	0.33	<0.01		

FLI, Fatty Liver Index; HSI, Hepatic Steatosis Index; CAP, controlled attenuated parameter

IV-7-2. Discussion de l'article 3

La mesure de l'élasticité du foie par élastographie transitoire peut être influencée par l'activité nécrotico-inflammatoire (Fung, Lai et al. 2010; Fung, Lai et al. 2011), la cholestase extra-hépatique (Millonig, Reimann et al. 2008) et la congestion vasculaire hépatique (Colli, Pozzoni et al. 2010) qui entraîne une surestimation de la fibrose du foie. Cependant, l'impact de la stéatose hépatique sur l'élastographie transitoire est encore inconnue. Une étude de l'équipe a démontré une augmentation de l'élasticité du foie par la stéatose du foie, estimée par le SteatoTest (Poynard, Ingiliz et al. 2008). Plus récemment, une étude a démontré l'influence de la stéatose sur l'élastographie hépatique en utilisant la biopsie comme référence (Boursier, de Ledinghen et al. 2013). Cette étude a rapporté un taux de 30% de surestimation de la fibrose hépatique par l'élastographie transitoire en présence d'une stéatose à la biopsie du foie. Notre étude a également démontré que la stéatose hépatique, estimée par plusieurs marqueurs non-invasifs, était indépendamment associée au faux positif de l'élastographie transitoire pour l'estimation de la fibrose du foie.

Notre étude a inclus des patients qui avaient un diabète de type 2 car la stéatose hépatique est très prévalente dans cette population. Afin de sélectionner les patients avec une fibrose minime et sans progression, nous avons sélectionné les patients qui avaient un FibroTest < 0.48 (F0F1 de METAVIR) déterminé par des examens répétés au cours des 7 dernières années. Les patients qui avaient une activité nécrotico-inflammatoire estimée par l'ActiTest (≥ 0.17 ; A1A2A3) ont également été exclus et les modèles multivariés ont été ajustés pour les concentrations sériques des enzymes hépatiques pour éliminer l'impact de l'inflammation sur l'élasticité du foie. Les patients inclus n'avaient pas d'ictère ni de signes d'insuffisance cardiaque droite pour exclure l'influence de la cholestase extra-hépatique et de la congestion vasculaire sur l'élastographie transitoire.

Au lieu d'une surestimation de la fibrose du foie par l'élastographie transitoire, on avait pu concevoir une sous-estimation de la fibrose par le FibroTest. Les concentrations sériques très élevées d'haptoglobine et d'Apo-A1 ou très faibles d'alpha-2-macroglobuline sont les facteurs associés aux faux-négatifs du FibroTest (Poynard, Munteanu et al. 2011). Les concentrations sériques des

protéines étaient similaires chez les patients qui avaient une surestimation présumée de la fibrose par l'élastographie transitoire. Seuls 4 patients avaient des concentrations sériques d'haptoglobine à la limite supérieure de la normale (≥ 3.20 g/L) et les résultats étaient similaires lorsque ces patients étaient exclus. Aucun patient n'avait un traitement pour une infection systémique, la cause la plus fréquente de concentrations sériques faibles d'haptoglobine. De plus, aucun patient n'avait une ascite volumineuse ou une dénutrition, causes d'une concentration sérique faible d'alpha-2-macroglobuline (Poynard, Ratziu et al. 2005). Les procédures pré-analytiques et analytiques ont été respectées pour la réalisation du FibroTest (Poynard, Muntenau et al. 2008). Tous les examens étaient interprétables sans présence de "*Warnings*" avertissant du risque de faux résultats. Ces augments sont en faveur d'une surestimation de la fibrose par l'élastographie et contre une par rapport la sous-estimation par le FibroTest.

Le fait que la stéatose hépatique, estimée par 4 marqueurs différents, soit associée au risque de faux-positif de l'élastographie transitoire renforce également notre première hypothèse. Les 3 biomarqueurs comportaient de paramètres similaires et ils étaient bien corrélés dans notre étude. Cependant, la formule de calcul est propre à chaque biomarqueur. De plus, l'estimation de la fibrose par la mesure du CAP, une méthode d'imagerie totalement différente des autres biomarqueurs, était également associée à la surestimation de la mesure de l'élasticité du foie. Comme la mesure du CAP n'est disponible qu'avec la sonde M, cette méthode n'était pas applicable que chez 40% des patients. Malgré la perte de puissance statistique due à l'exclusion de ces patients, la stéatose estimée par cette méthode est restait un facteur indépendant associé au risque de faux positif de l'élastographie transitoire.

Les facteurs associés à la non applicabilité de l'élastographie transitoire par la sonde M étaient similaire à ceux rapportés dans d'autres de l'équipe et indépendantes (Poynard, Ingiliz et al. 2008; Castera, Foucher et al. 2010). Les facteurs associés à la non-applicabilité de la mesure du CAP sont similaires à ceux décrits pour l'élastographie transitoire car la stéatose est estimée simultanément à l'élasticité du foie. Dans notre étude à décrits le taux de non applicabilité était plus élevé que dans une étude bordelaise partant sur des patients diabétiques (37% versus 18%) (de Ledinghen, Vergniol et al.

2012). L'échantillon de l'étude bordelaise était composé en majorité par des hommes, diabétiques de type 1 ayant un IMC < 30 Kg/m². Dans notre étude, nous avons inclus des diabétiques de type 2, en majorité des femmes obèses (IMC > 30 Kg/m²). En accord avec les résultats précédents, la sonde XL a permis de résoudre la plupart des examens non applicables avec la sonde M (de Ledinghen, Vergniol et al. 2010; de Ledinghen, Wong et al. 2012).

Les limites de l'étude sont l'absence de biopsie hépatique et l'effectif limité à une centaine de patients. Notre population était composée de patients diabétiques de type 2 qui avaient pour la plupart les enzymes hépatiques normales. Il est très difficile et discutable pour des raisons éthiques de réaliser une biopsie hépatique chez ces patients. Nous avons utilisé un biomarqueur, le FibroTest, qui a été validé pour l'estimation de la fibrose du foie chez les patients à haut risque de NAFLD (Poynard, Lassailly et al. 2012). Pour l'estimation de la stéatose nous avons utilisé 4 marqueurs non invasifs différents qui ont été ajustés pour d'autres facteurs confondants pour évaluer son impact sur la surestimation de la fibrose par l'élastographie transitoire. Nous avons limité l'effectif à des patients qui avaient une fibrose minime, confirmée par des déterminations répétées du FibroTest, à long terme.

Les points forts de notre étude ont été l'expérience de l'opérateur qui a réalisé l'élastographie transitoire et l'inclusion des patients qui avaient une grande prévalence de stéatose et une fibrose hépatique minime sans progression au cours des 7 dernières années. Les mesures d'élastographie transitoire ont été réalisées chez des patients à jeun de 12 heures par le même opérateur expérimenté (>1,000 examens) en éliminant l'effet de l'opérateur et celui de l'alimentation sur la mesure de l'élasticité du foie. L'hypothèse d'une fibrose minime a été confirmée par le fait qu'aucun patient n'ait développé de complication hépatique, comme une ascite, une encéphalopathie hépatique ou une rupture de varices oesophagiennes, durant la totalité de suivi. Afin d'éliminer l'influence de l'activité nécrotico-inflammation sur l'élastographie transitoire, nous avons exclu les patients qui avaient un ActiTest>0.17 (A1A2A3) et nous avons ajusté les modèles multivariés pour la présence d'une augmentation des enzymes hépatiques.

Chapitre V - Valeur pronostique du FibroMax chez les sujets à risque d'une stéatopathie non-alcoolique

V-1. Association entre stéatopathie non-alcoolique, diabète et dyslipidémie

La NAFLD est intimement associée aux paramètres du syndrome métabolique. La prévalence de la NAFLD est très élevée chez les patients atteints d'une obésité, d'un diabète du type 2 ou d'une dyslipidémie (Bugianesi, McCullough et al. 2005). La prévalence de la NAFLD passe de 27% chez les patients ayant une glycémie sérique normale à 43% chez les patients ayant une intolérance au glucose et 62% chez ceux qui sont diabétiques (Jimba, Nakagami et al. 2005). La prévalence de la NAFLD a été évaluée entre 21% et 78% chez les patients diabétiques, soit presque le triple par rapport à la population générale. Cette prévalence peut être sous-estimée car 80% des patients ayant une NAFLD ont des transaminases normales (Younossi, Gramlich et al. 2004; Leite, Salles et al. 2009). Les signes histologiques d'une NASH sont détectés chez 63% à 87% des patients diabétiques ayant une NAFLD détectée à l'échographie abdominale ou à la biopsie hépatique (Gupte, Amarapurkar et al. 2004; Amarapurka, Amarapurkar et al. 2006; Prashanth, Ganesh et al. 2009; Leite, Villela-Nogueira et al. 2011). Ces études ont démontré la présence d'une fibrose minime chez 22% à 60% des patients et un stade de fibrose $F \geq 3$ chez 3% à 9% des patients ayant un diabète de type 2.

Plus que la moitié des patients ayant une NAFLD ont une dyslipidémie (Smith and Adams 2011). La NAFLD a été associée aux concentrations sériques élevées de triglycérides et de LDL-cholesterol ou basses de HDL-cholesterol indépendamment de l'insulinorésistance (DeFilippis, Blaha et al. 2013). Un profile dyslipidémique similaire a été rapporté chez des patients diabétiques qui avaient une NAFLD (Toledo, Sniderman et al. 2006; Speliotes, Massaro et al. 2010)

V-2. Stéatopathie non-alcoolique et maladie cardiovasculaire

La maladie cardiovasculaire a été la cause principale de 864,480 décès (35% du total) et la cause secondaire associée à 507,520 décès pendant l'année 2005 aux États-Unis. La maladie cardiovasculaire a été la cause principale de mortalité au cours du 20^{ème} siècle dans ce pays, à l'exception de l'année 1918 [<http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>] ((NCHS) 2009)]. Les formes les plus fréquentes de maladie cardiovasculaire sont les complications coronariennes, comme l'infarctus du myocarde (IDM), l'angor instable et l'insuffisance cardiaque. Aux États-Unis, les complications coronariennes sont responsable de 502,000 décès annuels, dont 700,000 associés à un IDM qui entraînant un coût de 133 milliards de dollars. Actuellement 16,8 millions d'Américains (8,7 millions d'hommes et 8,1 millions de femmes) ont une maladie coronarienne documentée. La maladie cardiovasculaire silencieuse est encore plus prévalente [<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3000090-> (2009)]. En général, la maladie cardiovasculaire est associée aux facteurs de risque qui font partie du syndrome métabolique comme l'hypertension artérielle, l'obésité, la dyslipidémie, la consommation tabagique et le diabète de type 2. Les complications cardiovasculaires peuvent être évités par des mesures préventives primaires, comme le changement des habitudes de vie (Ebrahim, Taylor et al. 2011) et/ou secondaires, comme le traitement par des statines ou des anti-agrégants plaquettaires (Pande, Perlstein et al. 2011). Le score de Framingham est le score de référence pour prédire les complications cardiovasculaires (Greenland, Alpert et al. 2010). Ce score prend en compte les concentrations sériques de cholestérol total et HDL-cholestérol ainsi que l'histoire d'une hypertension artérielle, d'un diabète de type 2 et d'une consommation tabagique active ajustés pour l'âge et le sexe (Wilson, D'Agostino et al. 1998). La validation du score de Framingham repose sur plus de 2,000 publications des 50 dernières années (<http://www.framinghamheartstudy.org/biblio/index.html>). Ce score a été déjà validé chez les patients ayant une NAFLD (Treeprasertsuk, Leverage et al. 2012).

IV-2-1. Stéatopathie non-alcoolique et marqueurs d'athérosclérose

La NAFLD pourrait jouer un rôle important dans le processus d'athérosclérose, ce qui renforce la possible relation entre la maladie hépatique et les complications cardiovasculaires. (Marchesini, Brizi et al. 2001) Plusieurs études ont rapporté l'association entre la NAFLD et les marqueurs d'athérosclérose comme la présence de plaques carotidiennes, de plaques coronariennes et de la dysfonction cardiaque.

Le scan cardiaque multislice est précis pour évaluer la présence de plaques coronariennes par le score de calcium des artères coronaires (CAC). (Girshman and Wolff 2003; Budoff, Achenbach et al. 2006) Ce score est corrélé à la quantification totale des plaques coronariennes et reflète le risque de complications cardiovasculaires. (Wexler, Brundage et al. 1996) Les patients ayant une NAFLD ont plus de plaques coronariennes comparés aux patients contrôles, appariés pour l'âge et le sexe. (Chen, Nien et al. 2010) Le score CAC est significativement associé à la NAFLD indépendamment de facteurs confondants, y compris l'abondance du tissu adipeux viscéral (Kim, Choi et al. 2012). Une association a été rapportée entre la NAFLD et les plaques coronariennes vulnérables qui augmentent le risque des complications cardiovasculaires (Akabame, Hamaguchi et al. 2008).

La mesure de l'épaisseur intima-média carotidienne (EIMc) en échographie de mode B est une méthode sensible, non invasive et reproductible pour identifier et quantifier les maladies vasculaires à un stade préclinique et évaluer le risque cardiovasculaire (Taylor, Merz et al. 2003). (O'Leary, Polak et al. 1999; Lorenz, Markus et al. 2007) Plusieurs études ont associé l'EIMc et la présence de plaques carotidiennes avec la NAFLD indépendamment des facteurs métaboliques (Volzke, Robinson et al. 2005; Gastaldelli, Kozakova et al. 2009; Caserta, Pendino et al. 2010; Kozakova, Palombo et al. 2012) L'association de l'EIMc avec la NAFLD a été confirmée par une revue systématique qui a évalué 3,497 patients inclus dans 7 études. Cette étude a démontré une augmentation d'au moins 13% de l'EIMc et une prévalence plus élevée des plaques carotidiennes

chez les patients ayant une NAFLD (Sookoian and Pirola 2008). Une association a aussi été rapportée entre la sévérité de la maladie hépatique et la mesure de l'EIMc (Targher, Bertolini et al. 2006). Ce résultat renforce l'hypothèse selon laquelle les patients ayant une stéatohépatite peuvent avoir un risque plus élevé de complications cardiovasculaires par rapport à ceux ayant une stéatose simple.

Quelques études ont rapporté la relation entre la NAFLD et la dysfonction cardiaque. Une étude a démontré que la maladie hépatique était associée à l'hyperthrophie ventriculaire gauche et à la dysfonction diastolique cardiaque (Goland, Shimoni et al. 2006; Fotbolcu, Yakar et al. 2010). Les altérations structurales et fonctionnelles cardiaques étaient plus fréquentes chez les patients ayant une NAFLD que chez les individus sains appariés pour l'âge, le sexe et l'IMC (Hallsworth, Hollingsworth et al. 2013). Il y a aussi été montré que le dysfonctionnement cardiaque était corrélé à la sévérité de la maladie hépatique (Fallo, Dalla Pozza et al. 2009). Enfin, la NAFLD a été associée à l'arythmie cardiaque (Targher, Mantovani et al. 2013; Targher, Valbusa et al. 2013).

IV-2-2. Stéatopathie non-alcoolique et complications cardiovasculaires

Le diabète de type 2, l'insulino-résistance, l'obésité et la dyslipidémie sont des facteurs de risque communs à la NAFLD et à la maladie cardiovasculaire. Plusieurs études ont été menées pour évaluer si la maladie hépatique était associée à la maladie cardiovasculaire en raison de ces facteurs de risque communs ou si la NAFLD contribuait activement aux événements cardiovasculaires indépendamment des facteurs métaboliques. Un autre sujet d'étude a été de déterminer si la stéatose simple représente un risque accru de complications cardiovasculaires ou si la présence de lésions nécrotico-fibro-inflammatoires hépatiques, comme dans la NASH, est nécessaire pour déclencher le processus d'athérosclérose.

L'influence des composants du syndrome métabolique comme facteurs de confusion dans la maladie cardiaque ischémique des patients ayant une NAFLD reste inconnue (Zhao, Krasuski et al. 2009). Cependant, certaines études ont associé la maladie hépatique à la maladie cardiovasculaire indépendamment des facteurs métaboliques (Targher, Marra et al. 2008; Bhatia, Curzen et al. 2012).

Plusieurs études ont rapporté l'association de la NAFLD à la maladie cardiovasculaire en utilisant des transaminases comme marqueurs indirects ("*surrogate markers*"). La concentration sérique de GGT a été associée à la mortalité cardiovasculaire dans une cohorte autrichienne de 163,944 patients (Lee, Evans et al. 2007). Cette étude a également montré une relation dose-réponse claire entre l'enzyme hépatique et la maladie cardiovasculaire: l'augmentation d'une unité logarithmique de la GGT entraînait une augmentation en 60% de la mortalité cardiovasculaire. D'autres études ont rapporté des résultats similaires sur la relation entre la GGT et les complications cardiovasculaires, y compris une méta-analyse qui a évalué 10 études (Fraser, Harris et al. 2007). D'autres études ont décrit l'association d'une autre enzyme hépatique, l'ALAT, à la maladie cardiovasculaire (Schindhelm, Dekker et al. 2007; Dunn, Xu et al. 2008; Yun, Shin et al. 2009). Cependant, les enzymes hépatiques ne sont pas des marqueurs spécifiques de stéatose ou de fibrose du foie.

La NAFLD diagnostiquée par l'échographie a été significativement associée aux complications cardiovasculaires, comme l'infarctus du myocarde, l'angor instable ou l'accident vasculaire cérébral ischémique (Hamaguchi, Kojima et al. 2007). La prévalence de complications cardiovasculaires a été associée à la NAFLD indépendamment des facteurs confondants chez les patients diabétiques de type 2 (Targher, Bertolini et al. 2007). La maladie ischémique coronarienne, évaluée par angiographie, était plus fréquente chez les patients ayant une NAFLD que dans la population générale (Arslan, Turkoglu et al. 2007). La maladie coronarienne était également plus fréquente chez les patients ayant une cirrhose secondaire à une NASH que chez les cirrhotiques ayant une autre étiologie (Kadayifci, Tan et al. 2008). Plus récemment, d'autres études ont confirmé l'hypothèse d'une prévalence plus élevée des complications cardiovasculaires chez les patients ayant une NAFLD indépendamment des facteurs métaboliques (Wong, Wong et al. 2011; Stepanova and Younossi 2012). En conclusion, ces études ont clairement démontré l'existence d'une relation entre la maladie métabolique hépatique et la maladie cardiovasculaire.

IV-2-3. Mécanismes de liaison entre la stéatopathie non-alcoolique et la maladie cardiovasculaire

Dans la pathogénèse de la NAFLD-NASH, l'insulinorésistance entraîne une augmentation des acides gras libres conduisant à une stéatose hépatique qui représente le "*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 (plusieurs "*second hits*") entraîne une progression vers la NASH et par conséquent ses complications (Day and James 1998; Jou, Choi et al. 2008).

La possible relation entre la NAFLD et l'athérosclérose peut être associée à la pathogénèse et l'hypothèse du "*multi-hit*", anciennement connue comme "*double-hit*". Ce processus complexe prend en compte l'insulinorésistance, le stress oxydant et l'augmentation des cytokines inflammatoires (Kotronen, Juurinen et al. 2008). L'insulinorésistance semble être un facteur essentiel pour le développement de la NAFLD et la progression vers la NASH suivie d'une cascade cardiométabolique qui peut entraîner des complications cardiovasculaires (Fabbrini, Magkos et al. 2009).

La lipolyse du tissu adipeux viscéral secondaire à l'insulinorésistance représente une importante source d'acides gras libres (Bjorntorp 1990). L'accumulation de graisse dans le foie entraîne une inflammation par la lipotoxicité et augmente le stress oxydant provoqué par l'excès d'acides gras libres (Shoelson, Lee et al. 2006). La présence d'acides gras libres est fortement corrélée à l'inflammation et à la fibrose hépatique chez les patients ayant une NAFLD (Kotronen, Westerbacka et al. 2007; Despres, Lemieux et al. 2008; van der Poorten, Milner et al. 2008).

L'inflammation systémique, liée à la circulation de molécules pro-inflammatoires et athérogènes initialement sécrétées par le foie, peut jouer un rôle décisif dans la relation entre la NAFLD, l'athérosclérose et la maladie cardiovasculaire. Plusieurs études ont rapporté l'augmentation de concentrations sériques des cytokines pro-inflammatoires, comme la protéine C réactive, le TNF- α et l'interleukine-6, ainsi que des facteurs pro-thrombotiques comme le fibrinogène et

l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène chez les patients ayant une NASH (Lavie, Milani et al. 2009; Videla, Tapia et al. 2009; Dowman, Tomlinson et al. 2010).

Le profil d'une dyslipidémie pro-athérogène et d'une dysfonction endothéliale devrait également expliquer l'association entre la NAFLD et la maladie cardiovasculaire. La dyslipidémie pro-athérogène, définie par des concentrations sériques élevées de triglycérides et de LDL-cholestérol associée à une faible concentration sérique du HDL-cholestérol, est fortement corrélée aux complications cardiovasculaires (Gaziano, Hennekens et al. 1997). Plusieurs études ont montré que la NAFLD, spécialement sous la forme de la NASH, pourrait entraîner une dyslipidémie athérogène (Shoelson, Herrero et al. 2007; Stefan, Kantartzis et al. 2008). Le dysfonctionnement endothélial, un important facteur dans l'athérosclérose, a été indépendamment associé à la NAFLD (Schindhelm, Diamant et al. 2005; Villanova, Moscatiello et al. 2005). En plus, le dysfonctionnement endothélial était plus accentué chez les patients ayant une NASH que chez ceux ayant une stéatose simple, ce qui renforce l'hypothèse d'une association entre le risque cardiovasculaire et la sévérité de la maladie hépatique (Villanova, Moscatiello et al. 2005).

La Figure 4 résume les mécanismes qui associent la NAFLD au risque cardiovasculaire. Ce schéma met en évidence le rôle des facteurs métaboliques, de l'insulinorésistance, des acides gras libres et des cytokines inflammatoires, qui peuvent expliquer la relation entre les maladies hépatique et cardiovasculaire.

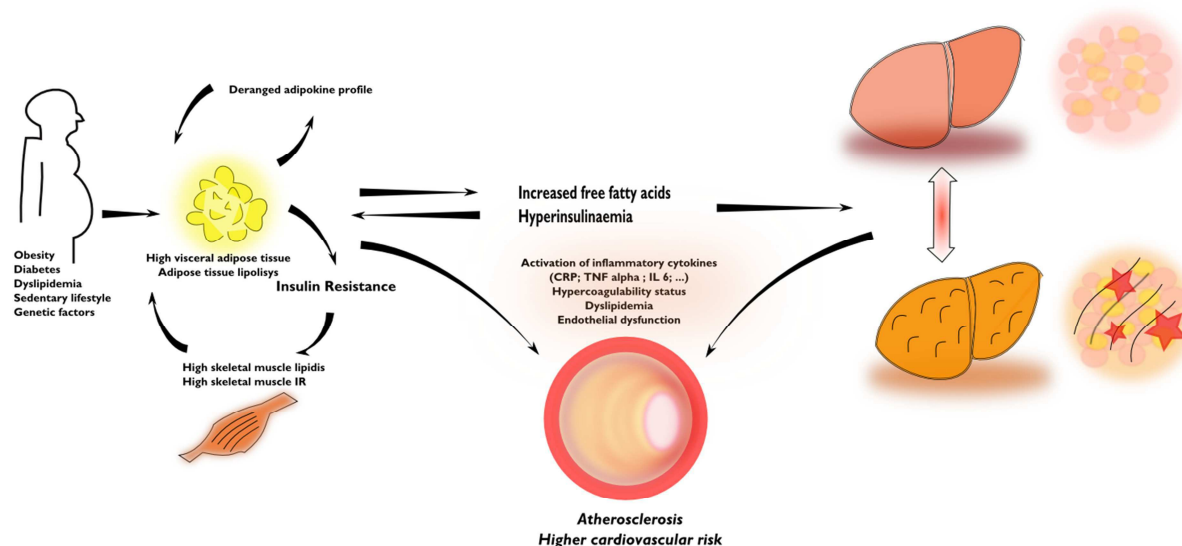


Figure 4. Les mécanismes qui peuvent expliquer la relation entre la stéatose métabolique et la maladie cardiovasculaire (Article annexe - Perazzo et al 2014)

V-3. Stéatopathie non-alcoolique et mortalité

La NAFLD semble être associée à une augmentation du taux de mortalité globale par rapport à la population générale, en particulier à cause de la maladie cardiovasculaire. Une étude de cohorte prospective a rapporté une augmentation de 34% de la mortalité globale chez les individus ayant une NAFLD (Adams, Lymp et al. 2005). L'association de la NAFLD à la mortalité globale a été confirmée dans une autre étude de cohorte menée aux Etats-Unis. (Ong, Pitts et al. 2008). Une autre étude a montré une augmentation de 70% du risque de mortalité globale chez les patients ayant une NAFLD par rapport à la population générale (Soderberg, Stal et al. 2010). Des résultats similaires ont été rapportés chez les patients diabétiques de type 2 ayant une NAFLD (Adams, Harmsen et al. 2010).

Cependant, quelques résultats contradictoires sur cette relation entre la NAFLD et la mortalité ont été rapportés. Une étude a démontré que la NAFLD était associée à la mortalité globale et la mortalité d'origine cardiovasculaire seulement dans un sous groupe de patients âgés entre 45 et 54 ans

(Dunn, Xu et al. 2008). Recemment, une étude prospective n'a pas montré de relation positive entre la NAFLD et la mortalité globale ou spécifique dans la population générale (Lazo, Hernaez et al. 2011). Ces résultats ont été confirmés par une étude qui a diagnostiqué la stéatose par échographie abdominale (Kim, Kim et al. 2013). En revanche, ces auteurs ont décrit l'impact de la fibrose hépatique, évaluée par des marqueurs non-invasifs, dans la mortalité globale des patients. La présence d'une fibrose avancée était associée à la mortalité globale et d'origine cardiovasculaire. Une autre publication a rapporté une prévalence plus élevée de la mortalité cardiovasculaire chez les patients ayant une NAFLD. En revanche, la présence de la stéatose n'était pas prédictive des complications cardiovasculaires (Stepanova and Younossi 2012).

La plupart des études épidémiologiques ont décrit la maladie cardiovasculaire comme l'une des causes les plus fréquentes de mortalité (Adams, Lymp et al. 2005; Dunn, Xu et al. 2008; Ong, Pitts et al. 2008; Dam-Larsen, Becker et al. 2009). La maladie cardiovasculaire était la cause la plus fréquente de mortalité chez 173 patients ayant une NAFLD prouvée par biopsie hépatique suivis pendant 13 ans (Rafiq, Bai et al. 2009). Ces auteurs ont rapporté un taux de mortalité globale plus élevé chez les patients ayant une NASH par rapport à ceux ayant une stéatose simple. D'autres auteurs ont confirmé ces résultats, en rapportant un taux de mortalité cardiovasculaire doublée dans la NASH par rapport à la stéatose simple pendant un suivi de 14 ans (Ekstedt, Franzen et al. 2006). Plus récemment, une étude a confirmé la maladie cardiovasculaire comme la cause la plus fréquente de mortalité dans la NAFLD diagnostiquée par biopsie du foie. En revanche, les auteurs n'ont pas démontré de différence de mortalité entre NASH et stéatose simple (Stepanova, Rafiq et al. 2013).

Le Tableau 16 résume les principales études prospectives qui ont évalué la relation de la NAFLD avec la mortalité globale et spécifique. En général, la NAFLD semble être associée à la mortalité globale, la maladie cardiovasculaire étant la cause de décès la plus fréquente. Cependant, des études sont encore nécessaires pour établir l'influence de principales lésions hépatiques, la fibrose, l'inflammation et la stéatose, dans la mortalité globale et d'origine spécifique.

Tableau 16. Les principales études qui ont rapporté la relation entre la stéatose métabolique et la mortalité globale et spécifique

Auteurs	n	Population (Pays)	Définition de NAFLD	Maladie cardiovasculaire (CV)	Suivi (Ans)	Résultats (95% Intervalle de Confiance)
(Adams, Lymp et al. 2005)	480	Population générale (Etats-Unis)	imagerie ou PBH	Certificats de décès	7.6	La maladie CV était l'une des causes principales de mortalité; taux de mortalité globale plus élevé [SMR 1.34(1.003-1.76); p=0.03] chez les patients ayant une NAFLD par rapport à la population générale
(Ekstedt, Franzen et al. 2006)	129	NAFLD associée à élévation des transaminases (Suède)	PBH	Certificats de décès	13.7	Survie similaire à une population contrôle appariée. Mortalité globale n'était pas augmentée en présence d'une stéatose simple. En revanche, les patients ayant une NASH ont présenté un taux de mortalité hépatique et CV plus élevé par rapport à ceux qui avaient une stéatose simple.
(Dunn, Xu et al. 2008)	7574	Population générale (Etats-Unis)	transaminases, imagerie ou PBH	Certificats de décès	8.7	La NAFLD n'était pas associée à la mortalité globale [HR 1.37 (0.98-1.91); p=0.067]. La mortalité CV était associée à la NAFLD chez les patients âgés entre 45 et 54 ans [HR 8.43 (2.43-22.72)]
(Ong, Pitts et al. 2008)	11285	Population générale (Etats-Unis)	échographie	Certificats de décès	8.7	La NAFLD était associée à la mortalité globale [HR 1.038 (1.036-1.041); p<0.001] et hépatique [HR 9.32 (9.21-9.43); p<0.001]; la maladie CV était la cause la plus fréquente de mortalité
(Rafiq, Bai et al. 2009)	173	NAFLD (Etats-Unis)	PBH	Certificats de décès	13	Maladie CV était la cause principale de mortalité. La mortalité globale était similaire chez les patients ayant une stéatose simple ou une NASH. La mortalité hépatique était supérieure dans la NASH et la mortalité globale chez les diabétiques ayant une NAFLD.
(Adams, Harmsen et al. 2010)	337	Diabétiques de type 2 (Etats-Unis)	échographie ou PBH	Certificats de décès	11	NAFLD a augmenté le risque de mortalité globale [HR 2.2 (1.1-4.2); p=0.03]. Risque de mortalité d'origine CV similaire entre les patients NAFLD versus non NAFLD [HR 0.9 (0.3-2.4); p=0.81]
(Soderberg, Stal et al. 2010)	256	Élévation des transaminases (Suède)	PBH	Certificats de décès	24	Maladie CV était la cause principale de mortalité. La NAFLD [SMR 1.69(1.24-2.25)] et la NASH [SMR 1.86(1.19-2.76)] avaient un taux de mortalité globale plus élevé par rapport à une population contrôle appariée.

Continuation de la Table 16. Les principales études qui ont rapporté la relation entre la stéatose métabolique et la mortalité globale et spécifique

Auteurs (Année)	n	Population (Pays)	Définition de NAFLD	Maladie cardiovasculaire (CV)	Suivi (ans)	Résultats (95% Intervalle de Confiance)
(Lazo, Hernaez et al. 2011)	11371	Population générale (Etats-Unis)	échographie	Certificats de décès	14.5	NAFLD n'était pas associé à la mortalité globale [HR 0.92 (0.67-1.09)]; CV [HR 0.86 (0.67-1.12)] ou d'origine hépatique [HR 0.64 (0.12-3.59)]
(Calori, Lattuada et al. 2011)	2074	Population générale (Italie)	Fatty Liver Index	Certificats de décès	15	La NAFLD était associée à la mortalité globale [HR 1.004 (1.001-1.007); p=0.03]; à la mortalité d'origine CV [HR 1.006 (1.000-1.011); p=0.04] et hépatique [HR 1.037 (1.022-1.053); p<0.001];
(Kim, Kim et al. 2013)	11154	Population générale (Etats-Unis)	échographie	Certificats de décès	14.5	NAFLD n'était pas associée à la mortalité globale. NAFLD avec une fibrose hépatique était associée à la mortalité globale [HR 1.69 (1.09-2.63); p=0.02] et d'origine CV [HR 3.46 (1.91-6.25); p<0.001]
(Stepanova, Rafiq et al. 2013)	289	NAFLD (Etats-Unis)	PBH	Certificats de décès	12.5	Maladie CV était la cause principale de mortalité. La mortalité globale et d'origine CV était similaire entre les patients ayant une NASH et ceux avec une stéatose simple. La NAFLD [HR 9.16 (2.10-9.88); p<0.001] et le diabète du type 2 [HR 2.19 (1.00-4.81); p<0.001] étaient associés à la mortalité d'origine hépatique
(Angulo P and PR 2013)	320	NAFLD (International)	PBH	Révision des dossiers médicales	8.8	Maladie CV était la cause principale de mortalité. La présence de fibrose hépatique avancée as per des marqueurs non-invasifs était associé à la mortalité globale: NFS [HR 9.8 (2.7-35.3); p<0.001]; APRI [HR 3.1 (1.1-8.4); p=0.03] et FIB-4 [HR 6.9 (2.3-20.4); p=0.001]

V-4. Objectifs du travail

La NAFLD est très prévalente chez les patients obèses (Boza, Riquelme et al. 2005), les diabétiques du type 2 (Leite, Salles et al. 2009) et ceux qui ont une dyslipidémie (Smith and Adams 2011). Cette maladie hépatique a un large spectre clinique qui va de la stéatose simple à la NASH, jusqu'au stade de cirrhose et ses complications (Angulo 2002). La NAFLD a été associée à des marqueurs d'athérosclérose, comme les plaques carotidiennes (Sookoian and Pirola 2008) et coronariennes (Chen, Nien et al. 2010) ainsi qu'à un risque plus élevé d'incidence des complications cardiovasculaires (Targher, Marra et al. 2008; Bhatia, Curzen et al. 2012). Le score de Framingham, le score standard pour prédire les complications cardiovasculaires, a été déjà validé dans la NAFLD (Treeprasertsuk, Leverage et al. 2012). En plus, plusieurs études ont rapporté l'association de la NAFLD à la mortalité globale et d'origine cardiovasculaire (Adams, Lymp et al. 2005) (Ong, Pitts et al. 2008) (Soderberg, Stal et al. 2010) (Adams, Harmsen et al. 2010).

La valeur pronostique pour prédire la mortalité globale et spécifique de quelques biomarqueurs a été déjà évaluée chez les patients ayant une NAFLD. Le "*Fatty Liver Index*" a été indépendamment associé à la mortalité globale et spécifique d'origine hépatique et cardiovasculaire (Calori, Lattuada et al. 2011). La présence d'une NAFLD, définie par échographie, associée à une fibrose hépatique avancée, présumé par le "*NAFLD fibrosis score*" (NFS) (Angulo, Hui et al. 2007), par l'APRI (Wai, Greenson et al. 2003) ou le FIB-4 (Shah, Lydecker et al. 2009), était un facteur de risque significativement associé à la mortalité globale et d'origine cardiovasculaire (Kim, Kim et al. 2013). Plus récemment, l'influence de la fibrose hépatique présumée par des marqueurs non-invasifs dans la survie globale a été validé dans une étude multicentrique qui a inclus des patients ayant une NAFLD confirmé par la biopsie hépatique (Angulo P and PR 2013).

La valeur prédictive du FibroTest a été déjà validée dans les hépatites virales C (Ngo, Munteanu et al. 2006; Vergniol, Foucher et al. 2011) et B (Ngo, Benhamou et al. 2008; de Ledinghen, Vergniol et al. 2013) ainsi que dans la maladie alcoolique du foie (Naveau, Gaude et al.

2009). Les patients ayant une fibrose hépatique avancée, d'après le FibroTest, avaient une survie globale et sans complications d'origine hépatique inférieure à ceux qui avaient une fibrose minime. La valeur pronostique du FibroTest a été validée dans la cirrhose virale C (FibroTest > 0.74) (Vergniol, Foucher et al. 2011). En plus, une méta-analyse a rapporté que la valeur pronostique du FibroTest était au moins aussi bonne que celle de la biopsie hépatique pour la prédiction de la mortalité globale (Poynard, Ngo et al. 2011). En revanche, la valeur pronostique du FibroTest n'avait pas été évaluée chez les patients à haut risque d'une NAFLD.

L'objectif primaire de l'étude était d'évaluer la valeur pronostique à 10 ans du FibroTest et du SteatoTest, pour la survie globale, la survie sans décès d'origine hépatique ou cardiovasculaire, chez les patients ayant un diabète de type 2 et/ou une dyslipidémie, deux pathologies fortement associées à la NAFLD.

Les objectifs secondaires ont été abordés de façon spécifique chez les diabétiques de type 2: 1) évaluer l'association du score de Framingham à la présence d'une fibrose hépatique avancée estimée par le FibroTest, pour la prédiction à 5 ans de complications cardiovasculaires. 2) évaluer l'association de la progression de la fibrose hépatique à l'incidence de complications cardiovasculaires.

V-5. Article 4: "Prognostic value of liver fibrosis and steatosis biomarkers in type 2 diabetes and dyslipidemia"

Title page

Prognostic value of liver fibrosis and steatosis biomarkers in type 2 diabetes and dyslipidemia

Short title: Prognostic value of liver biomarkers in diabetes and dyslipidemia.

Author Names:

Hugo Perazzo^{1,2}, Mona Munteanu³, Yen Ngo³, Pascal Lebray¹, Noemi Seurat¹, Fanny Rutka⁴, Marion Couteau⁴, Sophie Jacqueminet⁵, Philippe Giral⁶, Denis Monneret⁴, Françoise Imbert-Bismut⁴, Vlad Ratziau^{1,2}, Agnès Hartemann-Huertier⁵, Chantal Housset², Thierry Poynard^{1,2} for the FLIP Consortium

Department/Institution Names:

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Hepatology Department, Paris, France

² INSERM & Université Pierre et Marie Curie - Univ Paris 06, UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

³ BioPredictive, Paris, France

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biochemistry Department, Paris, France

⁵ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Diabetology Department, & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

⁶ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Dyslipidemia Department, & Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

Authors Mona Munteanu, Vlad Ratziau, Chantal Housset and Thierry Poynard for the FLIP Consortium

Corresponding Author:

Prof. Thierry Poynard

47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

E-mail: tpoynard@teaser.fr

Tel: +33 1 42 16 10 22

Fax: +33 1 42 16 14 27

Authors' involvements:

TP: study concept and design; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting; study supervision. HP: acquisition of data; analysis and interpretation of data; statistical analysis; drafting. CH: study concept and design; analysis and interpretation of data; study supervision; critical revision of the manuscript. MM: acquisition of data, analysis and interpretation of data; statistical analysis and critical revision of the manuscript. YN, PL, NS, FR, MC, SJ, PG and DM: acquisition of data. FIB, VR and AHH: critical revision of the manuscript.

Electronic word count: 4570

Abstract word count: 251

Number of Tables: 4

Number of Figures: 3

List of Abbreviations

NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease

BMI, body mass index

HbA1c, hemoglobin A1c

CI, confidence interval

RR, relative risk

HR, hazard ratio

Conflict of Interest Statement

TP is the inventor of FibroTest/SteatoTest and the founder of BioPredictive, the company that markets these tests. Patents belong to the French Public Organization Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. MM and YN are BioPredictive employees.

HP, PL, NS, FR, MC, SJ, PG, DM, FIB, VR, AHH and CH: These authors have no conflict of interest to disclose

Financial support:

This study was supported by funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under agreement no. HEALTHF2-2009-241762 for the project Fatty Liver: Inhibition of Progression (FLIP), from Association pour la Recherche sur les Maladies Virales Hépatiques (ARMHV) and from the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN)

Abstract

Background & Aims: In cardiometabolic disorders, nonalcoholic fatty liver disease is frequent and presumably associated with increased mortality and cardiovascular risk. We evaluated the prognostic value of non-invasive biomarkers of liver fibrosis (FibroTest) and steatosis (SteatoTest) in such disorders.

Methods: Patients with type 2 diabetes and/or dyslipidemia were prospectively followed for 5 to fifteen years. The cardiovascular Framingham-risk score was calculated; advanced fibrosis and severe steatosis, were defined by FibroTest>0.48 and SteatoTest>0.69, respectively, as previously established.

Results: 2312 patients were included. During a median follow-up of 12 years, 172 patients (7.4%) died. The leading causes of mortality were cancer (31%) and cardiovascular-related death (20%). In a multivariate Cox model adjusted for confounders: (i) the presence of advanced fibrosis was associated with overall mortality [1.78 (1.04-3.03); $p=0.03$] [hazard ratio (95% CI)] and liver-related death [100.92 (10.22-996.32); $p<0.0001$]; (ii) severe steatosis was associated with overall mortality [1.66 (1.18-2.35); $p=0.004$] and cardiovascular-related death [2.63 (1.21-5.73); $p=0.02$]; (iii) advanced fibrosis at baseline [$n=677$; 1.92 (1.04-3.55); $p=0.04$] and progression to advanced fibrosis during follow-up [$n=127$; 4.8 (1.5-14.9); $p=0.007$] were predictors of cardiovascular events in type-2 diabetic patients. In patients with a Framingham-risk score $\geq 20\%$, the 5-year survival without cardiovascular events was lower when advanced fibrosis was present [67% (50-80)] than when it was absent [86% (82-89); $p=0.007$].

Conclusion: FibroTest and SteatoTest have prognostic value for predicting overall survival and survival without cardiovascular or liver-related death, in patients with type 2 diabetes and/or dyslipidemia. FibroTest predicts cardiovascular events and improves the Framingham-risk score in type 2 diabetes.

Keywords: cardiovascular risk; mortality; nonalcoholic fatty liver disease; non-invasive biomarkers.

Introduction

Subjects with metabolic disorders such as type 2 diabetes or dyslipidemia, have a high risk of both cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD begins with steatosis, *i.e.* fat accumulation in hepatocytes, and can progress to liver fibrosis, cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma, which are associated with life-threatening complications [1]. Evidence has accumulated to indicate that NAFLD was associated with an increased prevalence of cardiovascular disease and overall mortality, independently of the classical cardiometabolic risk factors [2].

Historically, the severity of liver diseases has been assessed by liver biopsy. However, the usefulness of liver biopsy as an end-point marker has been challenged by limited feasibility, adverse effects, sampling error and interobserver variability. Non-invasive biomarkers have been proposed to replace liver biopsy. FibroTest, one of the most widely used markers of liver fibrosis, has demonstrated a prognostic value for the prediction of liver-related death in chronic hepatitis B and C, and in alcoholic liver disease [3-5]. FibroTest, is equally performant as liver biopsy for the prediction of overall mortality in these diseases [6]. Another marker, SteatoTest, has been validated as a marker of hepatic steatosis [7, 8]. So far, the prognostic values of FibroTest and SteatoTest have not been evaluated in NAFLD. The strong links between hepatic and cardiovascular diseases in patients with cardiometabolic disorders led us to postulate that these markers would have a global prognostic value in such populations.

The primary aim of the study was to evaluate the 10-year prognostic value of FibroTest and SteatoTest, for overall survival, survival without liver-related death, and survival without cardiovascular-related death, in patients with type 2 diabetes and/or dyslipidemia. The secondary aim, specifically addressed in type-2 diabetic patients, was to determine whether combining the

Framingham-risk score, which is based on classical cardiometabolic risk factors, with the presence or not of advanced liver fibrosis, as determined by FibroTest, would improve the 5-year prediction of cardiovascular events, and if the progression of liver fibrosis was associated with a higher incidence of cardiovascular events.

Patients and Methods

Study design

A longitudinal observational study of community-based cohorts was conducted at the Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. Patients primarily diagnosed with dyslipidemia (cohort 1, n=1916) or type 2 diabetes (cohort 2, n=747) followed from January 1999 to December 2012, were eligible to participate (n=2663 in total). The exclusion criteria were: any other cause of liver disease besides NAFLD, cardiac or liver transplantation, the absence of follow-up and missing data.

The study protocol was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, and was approved by the local Ethics Committee. All patients signed an informed consent upon enrollment in the study. The cohorts belong to FIBROFRANCE, a program organized in 1997 to assess the burden of chronic liver diseases in France (Clinical trial French registry n°: DRCD-2013-1 and ClinicalTrials.org n°: NCT01927133).

Evaluation of cardiometabolic risk factors

Clinical records included the measures of body mass index (BMI), waist circumference, blood pressure, and the reports on alcohol consumption and smoking. Metabolic syndrome was defined on the basis of the International Diabetes Federation criteria [9]. The Framingham-risk score was calculated using a standard score sheet that was gender specific, and included age, blood pressure, total cholesterol, HDL-cholesterol, smoking and diabetes history [10]. Patients with a Framingham-risk score $< 20\%$ and $\geq 20\%$ were classified into a low to moderate and high risk of cardiovascular disease, respectively.

Non-invasive liver biomarkers

FibroTest, ActiTest and SteatoTest (BioPredictive Paris, France; FibroSURE LabCorp Burlington, NC, USA) are algorithms including the serum concentrations of α 2-macroglobulin, apolipoprotein A1, haptoglobin, total bilirubin, and gamma-glutamyltransferase, adjusted for age and gender. In addition to these five components, SteatoTest includes the serum concentrations of alanine transaminase, fasting glucose, triglycerides and cholesterol, adjusted for age, gender and BMI, while ActiTest, a biomarker of hepatic necrotic/inflammatory lesions, includes alanine transaminase. The recommended pre-analytical and analytical procedures were applied [11]. The scores of these biomarkers range from 0 to 1.00, the highest scores being attributed to the most severe lesions. We previously established that advanced fibrosis (F2F3F4 according to the METAVIR histological scoring system) [12] could be determined by FibroTest >0.48 [13] and severe steatosis ($>32\%$ of hepatocytes, *i.e.* approximately S2S3 according to the SAF histological scoring system)[14], by SteatoTest >0.69 [7].

Follow-up and outcomes

The duration of follow-up was calculated from the day serum used for the analyses of liver biomarkers was collected (defining baseline), to the date a non-lethal or lethal event occurred. This interval was censored at the time of last follow-up. If several events occurred, the first one was taken into account.

The mortality rate and incidence of cardiovascular events were determined during follow-up. The causes of death were collected from the French national registry, according to the 10th International Classification of Diseases (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010>). The codes considered as diagnosis of cardiovascular-related death were: ischemic heart diseases (I20 to I25), cardiac arrest (I46), heart failure (I50), cerebrovascular diseases (I63 and I64) and cardiogenic shock (R57.0). The codes for liver-related death were: liver fibrosis and cirrhosis of liver (K74), nonalcoholic steatohepatitis (K75.8), portal hypertension (K76.6), oesophageal varices bleeding (I85.0), hepatocellular carcinoma (C22.0) and cholangiocarcinoma (C22.1). Death coded as R99 (other ill-defined and unspecified causes of mortality) was considered as unknown cause of death. The survival curve of the French population was calculated on the basis

of age, gender, follow-up period and conditional probabilities of death from official published census tables [15].

Type-2 diabetic patients from cohort 2 were evaluated for cardiovascular events, *i.e.* myocardial infarction, unstable angina, coronary by-pass (either angioplasty or surgical) and stroke. Information on treatments and cardiovascular events was collected by a trained investigator (HP) based on an extensive review of the medical records, an interview with patients and their primary care physicians. In addition, the coronary angiography database of the Cardiology Department was manually screened to identify interventional procedures. The analysis of liver biomarkers was repeated in these patients, during follow-up.

Statistical analysis

Continuous variables are reported as mean $\pm$ standard deviation if normally distributed or as median (range) if not. Discrete variables are reported as absolute and relative frequency. The Chi-square or Fisher's exact tests were used for qualitative comparisons. The analysis of variance, Kruskal-Wallis, Student's *t* or Mann-Whitney tests were used for quantitative comparisons. The Kaplan-Meier curves were plotted and the log-rank test was calculated for univariate analysis. We used the time-dependent Cox proportional hazard model for uni and multivariate analyses after checking that the main variables verified the proportional-hazard assumption using the Schoenfeld residuals. Models for mortality were adjusted for age, gender, metabolic factors, tobacco and alcohol consumption, as well as for hemoglobin A1c (HbA1c) in type-2 diabetic patients. The model for prediction of cardiovascular events was also adjusted for the Framingham-risk score and HbA1c in Model 1 and also for treatment in Model 2. Significance level was determined when $p \leq 0.05$ assuming two-tailed tests. Analysis was performed using Number Cruncher Statistical Systems 2008 (NCSS, Kaysville, UT, USA) and STATA package 2012 (StataCorp LP, College Station, TX, USA)

Results

Among the 2663 eligible patients, 2312 patients with type 2 diabetes and/or dyslipidemia, *i.e.* 1635 patients from cohort 1 and 677 patients from cohort 2, were included (Figure 1 and

Table S1). The entire population (52% male; mean age of 55 years; 36% with metabolic syndrome; mean BMI of 27.2 kg/m²) comprised 1401 dyslipidemic patients without type 2 diabetes and 911 type-2 diabetic patients including 644 with and 267 without dyslipidemia. Type-2 diabetic patients compared to dyslipidemic patients without diabetes, were older, they had higher BMI, more frequent metabolic syndrome, advanced fibrosis, and severe steatosis (Table 1). Among the type-2 diabetic patients 37% were treated with insulin and 64% with statins or fibrates for associated dyslipidemia. Median HbA1c in these patients was 8.1% (4.6-24.0), with levels < 7.0% defining well-controlled disease, and ≥ 9.5% defining decompensated disease, in 21% and 25% of the cases, respectively. Patients having both dyslipidemia and type 2 diabetes displayed the highest rates of advanced fibrosis and of severe steatosis (Table 1).

Mortality

During a median follow-up of 12.2 (0.1-14.5) years, 172 (7.4%) patients died. Non-liver cancer (31.2%) was the leading cause of death followed by cardiovascular-related death (20.2%). Liver-related death accounted for 4.1% of all deaths (Table 2). In patients with type 2 diabetes, with or without dyslipidemia (n=911 in total), cardiovascular disease was the leading cause of death (27.4%) (Table S2).

Patients who died compared to those who survived, were significantly older, they had higher systolic blood pressure, serum gamma-glutamyltransferase, fasting glucose, HbA1c and triglyceride levels, more frequent blood hypertension, type 2 diabetes and metabolic syndrome. Framingham-risk score, Fibrotest and SteatoTest were all higher in these patients (Table S3).

The overall mortality rate was 7.0 (95%CI 6.0-8.1) per 1,000-person-year. Patients with advanced fibrosis or severe steatosis, as determined by FibroTest/SteatoTest, had an overall mortality rate of 18.9 (11.6-30.8) per 1,000-person-year and 11.0 (8.4-14.6) per 1,000-person-year, respectively. The presence of advanced fibrosis or severe steatosis increased the risk of all-cause mortality, by 3-fold [RR=2.9 (95%CI 1.7-4.8); $p < 0.0001$] and 2-fold [RR=1.8 (1.3-2.5); $p = 0.0003$], respectively (Table S4). The presence of type 2 diabetes also increased mortality risk

[RR=1.7 (1.4-2.0); $p < 0.0001$]. Decompensated diabetes (HbA1c > 9.5%) was associated with increased mortality [HR=1.95 (1.13-3.36); $p = 0.02$]

Patients with advanced fibrosis had a significantly lower 10-year survival than those without [85% (95%CI 75-91) vs. 94% (93-95); $p < 0.0001$] (Figure 2A, Table S5). Patients with severe steatosis also had a 10-year survival lower than those without [89% (85-92) vs. 95% (94-96); $p = 0.0002$] (Figure 2B, Table S5). The presence of advanced fibrosis [HR=2.98 (95%CI 1.78-4.99); $p < 0.0001$] or severe steatosis [HR=1.86 (95%CI 1.34-2.58); $p = 0.0002$] increased the risk of mortality. These factors remained as independent factors related to overall mortality in multivariate model [FibroTest>0.48 HR=1.78 (1.04-3.03); $p = 0.03$ and SteatoTest>0.69 HR=1.66 (1.18-2.35); $p = 0.004$] (Table 3). In type-2 diabetic patients, advanced fibrosis was also independently associated with overall mortality after adjustment for HbA1c [HR=2.13 (1.03-4.42); $p = 0.04$]. Liver fibrosis or steatosis was also associated with an increased mortality in comparison with age- and gender-paired healthy controls from the French population (Table S6).

Specific liver-related and cardiovascular-related mortality

The 10-year survival without liver-related death was decreased in the presence of advanced fibrosis [93% (85-97) vs. 99% (99-100); $p < 0.0001$] (Figure 2C, Table S5). The 10-year survival without cardiovascular-related death was decreased in the presence of severe steatosis [96% (94-98) vs. 99% (98-99); $p = 0.0012$] (Figure 2D, Table S5). The presence of advanced fibrosis strongly increased the risk of liver-related death in univariate [HR=159.60 (19.15-1330.48); $p < 0.0001$] and multivariate [HR=100.92 (10.22-996.32); $p < 0.0001$] models. Severe steatosis increased by 3-fold cardiovascular-related death [RR=3.09 (1.56-6.12; $p = 0.0006$]. Severe steatosis remained as an independent factor related to cardiovascular-related death [HR=2.63 (1.21-5.73); $p = 0.02$] in multivariate model (Table 3).

Cardiovascular risk and liver fibrosis progression

Lethal and non-lethal cardio-vascular events were recorded type-2 diabetic patients from cohort 2. During a median follow-up of 7 years, 91 (13.4%) patients in this cohort 2, developed

133 cardiovascular events (Table S7). The incidence of cardiovascular events was 22.0 (95%CI 17.9-27.0) per 1,000-person-year. It was higher in patients with advanced fibrosis at baseline than in those without [45.2 (25.7-79.3) vs. 20.4 (16.4-25.4) per 1,000-person-year] (Table S4). In type 2 diabetic patients, the presence of advanced fibrosis [RR=2.2 (1.2-4.1); $p = 0.008$] and the presence of dyslipidemia, [RR=2.2 (1.4-3.6); $p = 0.0007$] increased the risk of cardiovascular events.

In cohort 2, type-2 diabetic patients with advanced fibrosis compared to those without, had a lower 5-year survival [75% (95%CI 61-85) vs. 89% (86-91); $p = 0.01$]. The presence of advanced fibrosis at baseline, increased the risk of cardiovascular events, in univariate [HR=2.18 (1.18-3.99); $p = 0.01$] and multivariate analyses [HR=1.92 (1.04-3.55); $p = 0.04$], after adjustment for the Framingham-risk score and HbA1c (Model 1). After adjusting this model for anti-diabetic, dyslipidemia and antiplatelet treatment (Model 2), the presence of advanced fibrosis showed a HR=1.82 (0.96-3.43); $p = 0.06$. A high Framingham-risk score ($\geq 20\%$) was associated with a lower survival without cardiovascular events, in comparison with a low-to-moderate Framingham-risk score [84% (80-87) vs. 93% (89-95); $p = 0.0002$] (Table 4). The combination of the Framingham-risk score with FibroTest improved the prediction of cardiovascular events. In patients with a high Framingham-risk score, those with advanced fibrosis had a lower survival without cardiovascular events than the others [67% (50-80) vs. 86% (82-89); $p = 0.007$] (Figure 3A).

Among the patients with type 2 diabetes, 136 (22%) underwent a reevaluation of their liver biomarkers after a median of 7 (6-8) years. Most patients (93%) had no advanced fibrosis at baseline and 28 (21%) developed fibrosis progression of at least 0.20 units of FibroTest, equivalent of one METAVIR stage of fibrosis. Among 127 patients without advanced fibrosis at baseline, 16 (13%) had progressed to advanced fibrosis upon reevaluation. Neither HbA1c nor insulin treatment were associated with liver fibrosis progression. In addition, 16 (13%) patients developed cardiovascular events (23 coronary diseases and 1 stroke). Survival without cardiovascular events was 69% (41-86) in patients who progressed to advanced fibrosis vs. 91%

(84-95) [$p = 0.008$] in those who did not (Figure 3B). Progression to advanced fibrosis increased the risk of cardiovascular events both in uni [HR=3.8 (95%CI 1.3-11.0); $p = 0.01$] and multivariate analysis, after adjustment on the Framingham-risk score and alcohol consumption [HR=4.8 (95%CI 1.5-14.9); $p = 0.007$].

Discussion

This study demonstrates the prognostic value of biomarkers assessing liver fibrosis and steatosis, *i.e.* FibroTest and SteatoTest, respectively, in patients with type 2 diabetes and/or dyslipidemia. Both disorders are commonly associated with NAFLD. Our hypothesis was that liver fibrosis would be a major risk factor for liver-related mortality, and steatosis, a surrogate marker of atherosclerosis. Accordingly, FibroTest and SteatoTest allowed us to better separate the risks of liver-related and cardiovascular complications. In addition, we found a significant prognostic value of FibroTest for cardiovascular outcomes and overall mortality.

Liver-related mortality

We previously demonstrated that the presence of liver fibrosis evaluated by FibroTest was strongly associated with increased overall mortality and liver-related death in various chronic liver diseases.[3-6] Here, the demonstration was extended to a population at high risk of NAFLD. Recently, the prognostic value of other fibrosis markers, including NAFLD fibrosis score, Aspartate transaminase/platelet ratio index and FIB-4, was reported in patients with ultrasound-defined NAFLD [16, 17]. Relying on these biomarkers, advanced fibrosis was also independently associated with overall mortality and liver-related death in patients with biopsy-proven NAFLD.[18] However, fibrosis may have been overestimated by these markers, which integrate transaminases in their formula, as opposed to FibroTest.

Cardiovascular outcomes

Steatosis is associated with coronary artery disease [19] and NAFLD patients have increased surrogate markers of atherosclerosis, such as carotid intima medial thickness or coronary artery calcification [20, 21]. Yet, so far, it was unknown if the association between

steatosis and cardiovascular-related death was still significant after adjustment on a fibrosis estimate.

Our study showed that the presence of advanced fibrosis, estimated by FibroTest, was predictive of the 5-year survival without cardiovascular events in patients with type 2 diabetes after adjustment for confounding factors, such as diabetes severity, treatment and the Framingham-risk score. This latter score is well validated for the prediction cardiovascular events, relying on 2000 publications since 1950 (<http://www.framinghamheartstudy.org/biblio/index.html>). It has also been validated in NAFLD patients for the prediction of cardiovascular outcomes [22]. We confirmed the prognostic value of the Framingham-risk score for the prediction of survival without cardiovascular events, in patients with type 2 diabetes. FibroTest improved the Framingham-risk score, particularly in patients at high risk of cardiovascular complications (score $\geq$ 20%). Furthermore, liver fibrosis progression, estimated by the FibroTest, was associated with a higher incidence of cardiovascular events.

Apolipoprotein A1, the protein transporting HDL-cholesterol, is a component of FibroTest and could have been a confounding prognostic factor for cardiovascular-related complications and death. Therefore, we verified the independent performance of FibroTest and of each component of the FibroTest/SteatoTest after adjustment for apolipoprotein A1 in two multivariate models (Table S8).

The presence of severe steatosis, assessed by SteatoTest (>0.69), was independently associated with overall and cardiovascular mortality risk but not with liver-related death. The mechanisms explaining the association between steatosis and mortality independently of fibrosis are unknown. Liver fibrosis and atherosclerosis may be linked by common systemic factors or a causal relationship between nonalcoholic steatohepatitis, which is the necrotic/inflammatory pro-fibrogenic form of NAFLD, and a vascular proinflammatory/prothrombotic state leading to atherosclerosis [23]. We verified that a marker of necrosis/inflammation (ActiTest) had no independent prognostic value when fibrosis and steatosis were taken into account (Tables S4 and S5).

Discrepancy between studies on mortality associated with NAFLD

Conflicting results regarding the association between NAFLD and mortality have been reported, likely because no specific marker of fibrosis, nor quantitative assessment of steatosis have been used. In three studies, NAFLD was not associated with a higher risk of mortality, except in a subpopulation over 45 years of age, more prone to fibrosis than younger subjects [16, 24, 25]. In five other studies, NAFLD was associated with mortality including in a cohort of type-2 diabetic patients [26-30]. In these latter studies the diagnosis of steatosis was based on imaging methods or liver enzymes. Ultrasonography and alanine transaminase are less accurate than SteatoTest and FibroTest for the diagnosis of steatosis and fibrosis, respectively, which might explain conflicting results [7, 13, 31, 32].

Strengths and limitations

The strengths of our study include a large size of the study population, long duration of follow-up, mortality data collection from the national registry and the confrontation of liver biomarkers with the Framingham-risk score. The mortality data enabled evaluation of the biomarker performance against death, an indisputable gold standard. Despite the need for independent validation, information provided by FibroTest could improve the Framingham-risk score for predicting cardiovascular outcome.

The study population was not confined to NAFLD defining criteria but encompassed a large spectrum of metabolic disorders. The leading cause of death was non-liver cancer in dyslipidemia, and cardiovascular-related death in type 2 diabetes (Table S2). Consistent with previous observations, we found an impact of HbA1c on overall mortality,[33] a high prevalence of steatosis in type-2 diabetic patients (47%)[34] and a close association between the number of metabolic factors and advanced fibrosis [35].

Limitations were the high percentage of unknown cause of death, the retrospective collection of cardiovascular complications, restricted to the diabetic patients and the relatively small number of patients with prospective evaluation of fibrosis progression. Except for few significant differences, major risk factors were similar in patients with unknown and known

causes of death. Patients evaluated and non-evaluated for fibrosis progression were not different either with respect to the main prognostic factors (Tables S9 and S10). Including patients in a tertiary center, with prophylactic treatment by antiplatelet drugs reduced the mortality risk. Details on specific treatments (insulin, antiplatelet and statins or fibrates) were fully available only for patients from the cohort 2. Therefore we did not include these parameters in the multivariate analysis for overall mortality. However, we verified in a model including the treatment factor that FibroTest/SteatoTest were still significant for mortality prediction. (Table S11)

Liver biomarkers, such as FibroTest and SteatoTest, are of particular interest in patients with metabolic disorders. They have prognostic value for predicting overall survival and allow a better evaluation not only of the hepatic risk, but also of the cardiovascular risk. They are useful to identify the patients with abnormal liver function tests, in whom the absence of advanced fibrosis assessed by FibroTest virtually excludes the risk of severe liver complications at 10-year. They can improve the Framingham-risk score in type 2 diabetes and pave the way for the development of a "cardio-liver" prognostic index in patients with metabolic disorders.

References

- [1] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
- [2] Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010;363:1341-1350.
- [3] Naveau S, Gaude G, Asnacios A, Agostini H, Abella A, Barri-Ova N, et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:97-105.
- [4] Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, Bernard PH, le Bail B, Merrouche W, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011;140:1970-1979.
- [5] de Ledinghen V, Vergniol J, Barthe C, Foucher J, Chermak F, Le Bail B, 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.
- [6] Poynard T, Ngo Y, Perazzo H, Munteanu M, Lebray P, Moussalli J, et al. Prognostic value of liver fibrosis biomarkers: a meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011;7:445-454.
- [7] Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol* 2005;4:10.
- [8] Poynard T, Lassailly G, Diaz E, Clement K, Caiazzo R, Tordjman J, et al. Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS One* 2012;7:e30325.
- [9] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469-480.
- [10] Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-1847.
- [11] Poynard T, Munteanu M, Deckmyn O, Ngo Y, Drane F, Messous D, et al. Applicability and precautions of use of liver injury biomarker FibroTest. A reappraisal at 7 years of age. *BMC Gastroenterol* 2011;11:39.

- [12] Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994;20:15-20.
- [13] Halfon P, Munteanu M, Poynard T. FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2008;32:22-39.
- [14] Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751-1759.
- [15] Vallin J, Meslé F. Tables de Mortalité Françaises pour les XIXe et XXe Siècles et Projections pour le XXIe Siècle. Paris: Institut National d'Etudes Démographiques 2001.
- [16] Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology* 2013;57:1357-1365.
- [17] Treeprasertsuk S, Bjornsson E, Enders F, Suwanwalaikorn S, Lindor KD. NAFLD fibrosis score: a prognostic predictor for mortality and liver complications among NAFLD patients. *World J Gastroenterol* 2013;19:1219-1229.
- [18] Angulo P, Bugianesi E, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Barrera F, et al. Simple Noninvasive Systems Predict Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2013;145:782-789.
- [19] Wong VW, Wong GL, Yip GW, Lo AO, Limquiaco J, Chu WC, et al. Coronary artery disease and cardiovascular outcomes in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2011;60:1721-1727.
- [20] Kim D, Choi SY, Park EH, Lee W, Kang JH, Kim W, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcification. *Hepatology* 2012;56:605-613.
- [21] Siddiqui MS, Sterling RK, Luketic VA, Puri P, Stravitz RT, Bouneva I, et al. Association between high-normal levels of alanine aminotransferase and risk factors for atherogenesis. *Gastroenterology* 2013;145:1271-1279.

- [22] Treeprasertsuk S, Leverage S, Adams LA, Lindor KD, St Sauver J, Angulo P. The Framingham risk score and heart disease in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2012;32:945-950.
- [23] Nseir W, Shalata A, Marmor A, Assy N. Mechanisms linking nonalcoholic fatty liver disease with coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2011;56:3439-3449.
- [24] Dunn W, Xu R, Wingard DL, Rogers C, Angulo P, Younossi ZM, et al. Suspected nonalcoholic fatty liver disease and mortality risk in a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2263-2271.
- [25] Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ* 2011;343:d6891.
- [26] Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation* 2005;112:2130-2137.
- [27] 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;129:113-121.
- [28] Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008;49:608-612.
- [29] Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, Charatcharoenwitthaya P, Enders FB, Therneau T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1567-1573.
- [30] Calori G, Lattuada G, Ragogna F, Garancini MP, Crosignani P, Villa M, et al. Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology* 2011;54:145-152.
- [31] Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745-750.

- [32] Canbakan B, Senturk H, Canbakan M, Toptas T, Tabak O, Balci H, et al. Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease? *Biomark Med* 2010;4:205-214.
- [33] Currie CJ, Peters JR, Tynan A, Evans M, Heine RJ, Bracco OL, et al. Survival as a function of HbA(1c) in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. *Lancet* 2010;375:481-489.
- [34] Williamson RM, Price JF, Glancy S, Perry E, Nee LD, Hayes PC, et al. 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* 2011;34:1139-1144.
- [35] Grattagliano I, Ubaldi E, Napoli L, Marulli CF, Nebiacolombo C, Cottone C, et al. Utility of noninvasive methods for the characterization of nonalcoholic liver steatosis in the family practice. The "VARES" Italian multicenter study. *Ann Hepatol* 2013;12:70-77.

Table 1. Baseline characteristics of the patients according to their metabolic disorder

	All (n=2312)	Dyslipidemia no diabetes (n=1401)	Type 2 Diabetes no dyslipidemia (n=267)	Type 2 Diabetes + dyslipidemia (n=644)	<i>p</i> value
Age, years (a)	55 ± 12	49 ± 13	57 ± 12	59 ± 10	<0.0001
Male gender (c)	1193 (52)	657 (47)	138 (52)	398 (62)	<0.0001
Alcohol consumption, g/day (b)	0 (0–230)	0 (0–50)	0 (0–70)	0 (0–230)	0.0007
Follow-up, years (b)	12.2 (0.1–14.5)	12.7 (0.1–14.5)	6.9 (0.1–9.4)	7.4 (0.1–14.5)	<0.0001
Liver biomarkers					
FibroTest score (a)	0.18 ± 0.13	0.16 ± 0.11	0.18 ± 0.15	0.21 ± 0.16	<0.0001
Advanced fibrosis (F2F3F4) FibroTest>0.48 (c)	95 (4.1)	30 (2.1)	14 (5.2)	51 (7.9)	<0.0001
SteatoTest score (a)	0.47 ± 0.23	0.40 ± 0.22	0.51 ± 0.21	0.62 ± 0.20	<0.0001
Severe steatosis (>32%) SteatoTest>0.69 (c)	470 (20.4)	156 (11.2)	62 (23.3)	252 (39.3)	<0.0001
Liver Function tests					
ALT, U/L (a)	32 ± 21	31 ± 18	31 ± 18	34 ± 25	0.003
AST, U/L (a)	28 ± 15	29 ± 16	26 ± 11	28 ± 12	0.03
GGT, U/L (a)	42 ± 53	37 ± 45	46 ± 58	50 ± 64	<0.0001
Cardiometabolic risk factors					
Systolic blood pressure, mmHg (a)	130 ± 16	129 ± 16	126 ± 15	132 ± 16	<0.0001
Diastolic blood pressure, mmHg (a)	77 ± 10	79 ± 9	71 ± 11	75 ± 11	<0.0001
Fasting blood glucose, mmol/L (a)	6.4 ± 2.9	4.9 ± 0.5	9.2 ± 3.6	8.6 ± 3.2	<0.0001
Triglycerides, mmol/L (a)	1.6 ± 1.5	1.4 ± 1.2	1.5 ± 1.2	2.2 ± 2.2	<0.0001
Total cholesterol, mmol/L (a)	5.9 ± 1.5	6.5 ± 1.4	4.9 ± 1.0	5.2 ± 1.3	<0.0001
LDL cholesterol, mmol/L (a)	3.7 ± 1.4	4.3 ± 1.3	2.8 ± 0.8	3.0 ± 1.1	<0.0001
HDL cholesterol, mmol/L (a)	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.4	<0.0001
HbA1c, % (b)	8.1 (4.6–24.0)	NA	8.0 (5.0–14.3)	8.2 (4.6–24.0)	0.23
Dyslipidemia treatment (c) (statins or fibrates)	1284 (56)	751 (54)	24 (9)	509 (80)	<0.0001
Antiplatelet treatment (c)	227 (33)	NA	41 (16)	186 (43)	<0.0001
Insulin treatment (c)	259 (12)	NA	89 (34)	170 (39)	0.12
Metabolic syndrome (c)	721 (36)	297 (22)	108 (72)	316 (67)	<0.0001
BMI, Kg/m² (a)	27.2 ± 5.3	25.5 ± 4.3	28.9 ± 5.8	30.0 ± 5.8	<0.0001
Blood hypertension (c)	1287 (56)	693 (49)	121 (46)	473 (74)	<0.0001
Current smoking (c)	980 (42)	667 (48)	64 (24)	249 (39)	<0.0001
Framingham-risk score % (a)	17 ± 13	12 ± 10	21 ± 12	27 ± 13	<0.0001

Data expressed as (a) means ± standard deviation, (b) median (range) or (c) absolute (%), NA, not available.

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; HbA1c, Hemoglobin A1c ; BMI, body mass index.

Missing data (n): dyslipidemia treatment (19); antiplatelet treatment (1618), insulin treatment (215), Metabolic syndrome (311)

Table 2. Specific causes of death and 10-year Kaplan-Meier mortality rate

	10-year mortality	
	n (%)	(95%CI)
Non-liver cancer	54 (31.2)	2.4% (1.7–3.1)
– Lung cancer	14 (26)	
– Colon-rectal cancer	6 (11)	
– Urinary cancer	6 (11)	
– Breast cancer	5 (9)	
– Pancreatic cancer	5 (9)	
– Hematologic cancer	4 (7)	
– Cerebral cancer	4 (7)	
– Upper gastrointestinal cancer	3 (6)	
– Genital cancer	3 (6)	
– Head and neck cancer	2 (4)	
– Neuroendocrine cancer	1 (2)	
– Carcinoma of unknow primary site	1 (2)	
Cardiovascular-related death	35 (20.2)	1.3 % (1.1–2.2)
– Ischemic heart disease	14 (40)	
– Cardiac arrest	10 (28)	
– Heart failure	8 (23)	
– Cardiogenic shock	2 (6)	
– Cerebrovascular disease	1 (3)	
Liver-related death	7 (4.1)	0.3% (0.08–0.6)
– Hepatocellular carcinoma	4 (57)	
– Cholangiocarcinoma	2 (29)	
– Cirrhosis	1 (14)	
Others or unknown	76 (44.5)	2.5% (1.8–3.2)

Other causes of death were [10th International Classification of Diseases (n)] respiratory disease [J18.9 (6), W79.9 (4)]; natural death [R09.2 (3)]; sepsis [A41.9 (3)]; pancreatitis [K85(1), K86.1(1)]; adrenocortical insufficiency [E27.4(1)]; non-variceal gastrointestinal bleeding [K92.2 (1)]; suicide [X70 (1)]; accident [X59(1)] and unknown [R99 (54)]

Table 3. Prognostic value of liver biomarkers for the prediction of overall survival, survival without cardiovascular-related death and survival without liver-related death.

	Overall Survival	<i>p</i> value	Survival without CV-related death	<i>p</i> value	Survival without liver-related death	<i>p</i> value
Univariate analysis HR (95%CI)						
No advanced fibrosis (FibroTest ≤ 0.48)	Reference		Reference		Reference	
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	2.98 (1.78-4.99)	< 0.0001	1.64 (0.39-6.83)	0.50	159.60 (19.15-1330.48)	< 0.0001
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference		Reference		Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.86 (1.34-2.58)	0.0002	2.93 (1.48-5.81)	0.002	3.14 (0.70-14.08)	0.13
Multivariate analysis HR (95%CI)						
Entire study population (n=2312)						
Model adjusted for age, gender, blood hypertension, dyslipidemia tobacco, alcohol consumption						
No advanced fibrosis (FibroTest ≤ 0.48)	Reference		Reference		Reference	
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	1.78 (1.04-3.03)	0.03	1.24 (0.29-5.42)	0.29	100.92 (10.22-996.32)	<0.0001
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference		Reference		Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.66 (1.18-2.35)	0.004	2.63 (1.21-5.73)	0.02	3.03 (0.64-14.31)	0.16
Sub-group of type 2 diabetic patients (n=911)						
Model adjusted for age, gender, blood hypertension, dyslipidemia, tobacco, alcohol consumption, HbA1c						
No advanced fibrosis (FibroTest ≤ 0.48)	Reference		Reference		Reference	
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	2.13 (1.03-4.42)	0.04	0.93 (0.11-7.70)	0.95	Not performed	
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference		Reference		Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.45 (0.78-2.69)	0.24	1.29 (0.35-4.82)	0.70	Not performed	

CV, cardiovascular; HbA1c, Hemoglobin A1c. Missing data (n): HbA1c (229), multivariate analysis for liver-related death adjusted for HbA1c in type 2 diabetic patients was impossible to be performed because of very low events.

Table 4. Prognostic values of liver biomarkers and Framingham-risk score for the 5-year survival without cardiovascular events in type 2 diabetic patients (cohort 2)

	% CV events	5-year survival (95% CI)	<i>p</i> value	Univariate Cox HR (95% CI)	<i>p</i> value	Multivariate Model 1 HR (95% CI)	<i>p</i> value	Multivariate Model 2 HR (95% CI)	<i>p</i> value
Liver biomarkers									
No advanced fibrosis (FibroTest ≤ 0.48)	13	89% (86-91)		Reference		Reference		Reference	
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	24	75% (61-85)	0.01	2.18 (1.18-3.99)	0 .01	1.92 (1.04-3.55)	0.04	1.82 (0.96-3.43)	0.06
No severe steatosis (SteatoTest ≤ 0.69)	13	89% (86-92)		Reference		Reference		Reference	
Severe steatosis (SteatoTest > 0.69)	15	85% (79-89)	0.32	1.28 (0.83-1.95)	0.26	1.24 (0.80-1.90)	0.34	1.20 (0.77-1.89)	0.42
Risk Factors									
HbA1c < 9.5%	14	88% (85-91)		Reference		Reference		Reference	
HbA1c ≥ 9.5%	14	87% (82-92)	0.95	1.02 (0.63-1.63)	0.95	1.04 (0.65-1.66)	0.15	0.91 (0.55-1.50)	0.70
Oral anti diabetic drug	11	90% (87-93)		Reference		Reference		Reference	
Insulin treatment	18	84% (80-89)	0.01	1.67 (1.10-2.53)	0.02	1.66 (1.08-2.57)	0 .02	1.21 (0.79-1.88)	0.39
No statins or fibrates	8	94% (91-97)		Reference		Reference		Reference	
Statins or fibrates	18	83% (79-87)	0.0001	2.59 (1.60-4.20)	0.0001	2.32 (1.43-3.77)	0.0007	1.32 (0.78-2.25)	0 .30
No antiplatelet treatment	7	94% (92-97)		Reference		Reference		Reference	
Antiplatelet treatment	27	74% (68-80)	<0.0001	4.74 (3.04-7.38)	<0.0001	4.32 (2.73-6.83)	< 0.0001	3.75 (2.27-6.19)	< 0.0001
Low-moderate FRS (FRS < 20%)	8	93% (89-95)		Reference		Reference		Reference	
High FRS (FRS ≥ 20%)	18	84% (80-87)	0.0002	2.34 (1.49-3.69)	0.0002	2.42 (1.52-3.83)	0.0002	1.62 (1.01-2.60)	0 .04
Association									
FibroTest-FRS									
High FRS									
No advanced fibrosis	16	86% (82-89)		Reference		Reference		Reference	
High FRS									
Advanced fibrosis	32	67% (49-80)	0.007	2.29 (1.22-4.29)	0.01	2.31 (1.23-4.34)	0.01	2.24 (1.16-4.33)	0 .02

Multivariate Cox Model 1 adjusted for the Framingham-risk score and diabetes control (HbA1c); Cox Model 2 adjusted for liver fibrosis (FibroTest), Framingham-risk score, HbA1c and treatment (anti diabetic, antiplatelet and dyslipidemia drugs).CV, cardiovascular; FRS, Framingham-risk score; CI, confidence interval; HR, hazard ratio. Missing data (n): HbA1c (10), anti-diabetic treatment (10), statins or fibrates treatment (11), antiplatelet treatment (12).

Figures Legends

Figure 1. Study flowchart

Figure 2. Kaplan-Meier curves of 10-year survival according to: (A) FibroTest (FT) and (B) SteatoTest (ST) for the overall survival; (C) FibroTest (FT) for the survival without liver-related death; (D) SteatoTest (ST) for the survival without cardiovascular-related death [all log-rank test].

Figure 3. Kaplan-Meier curves of the 5-year survival without cardiovascular events in type-2 diabetic patients according to (A) the association between the Framingham risk-score (FRS) and liver fibrosis stage estimated by FibroTest (FT) and (B) the progression to advanced fibrosis (AF) estimated by FibroTest (FT) [all log-rank test].

Figure 1.

Figure 1.

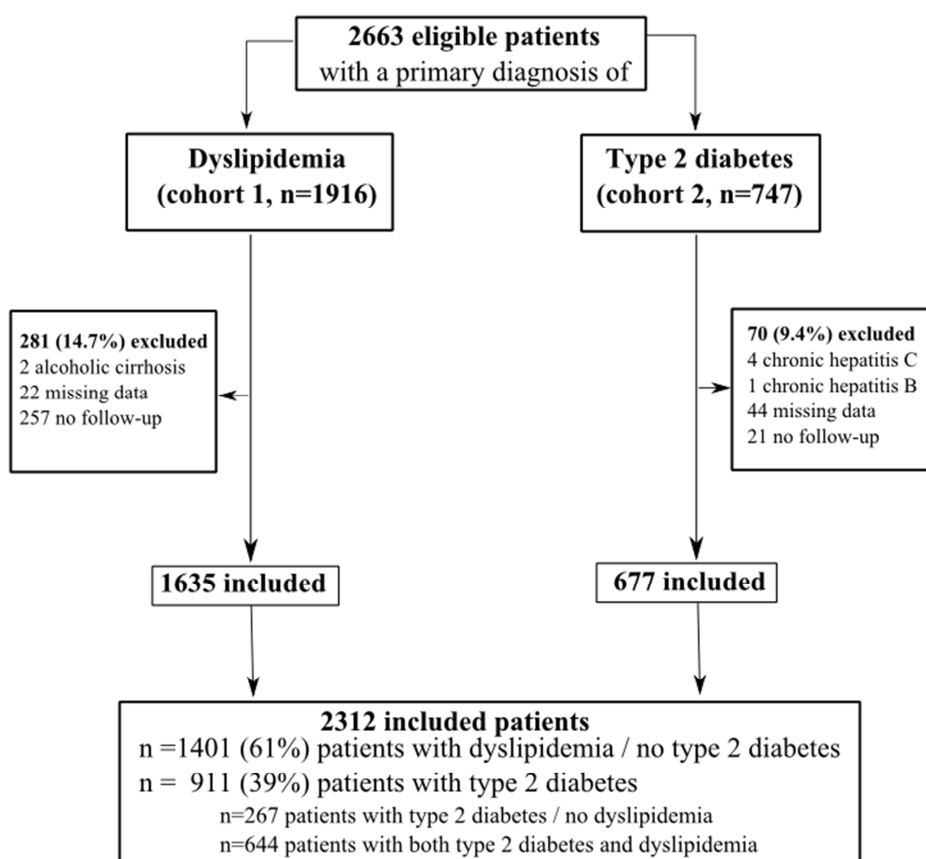


Figure 2.

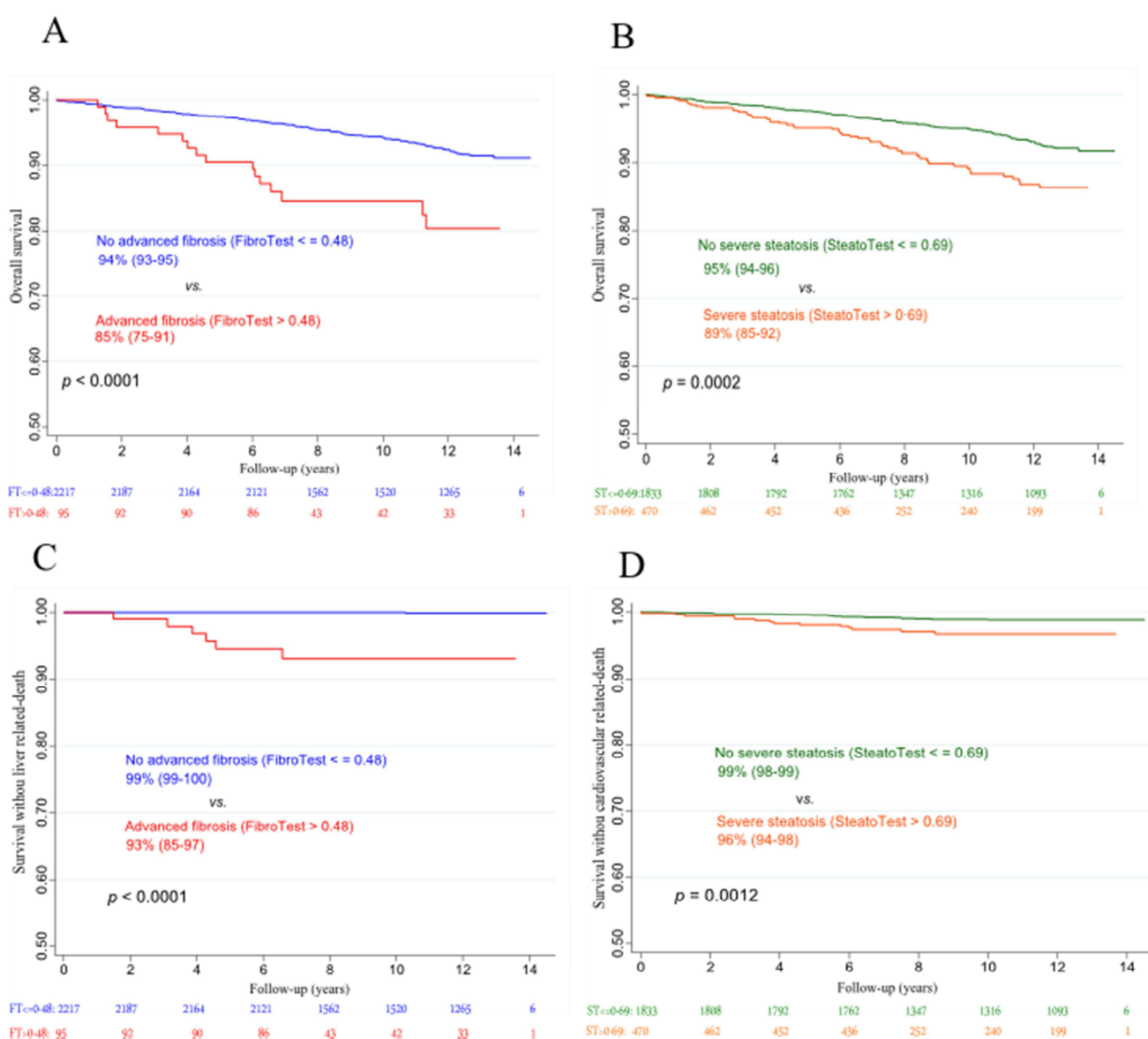
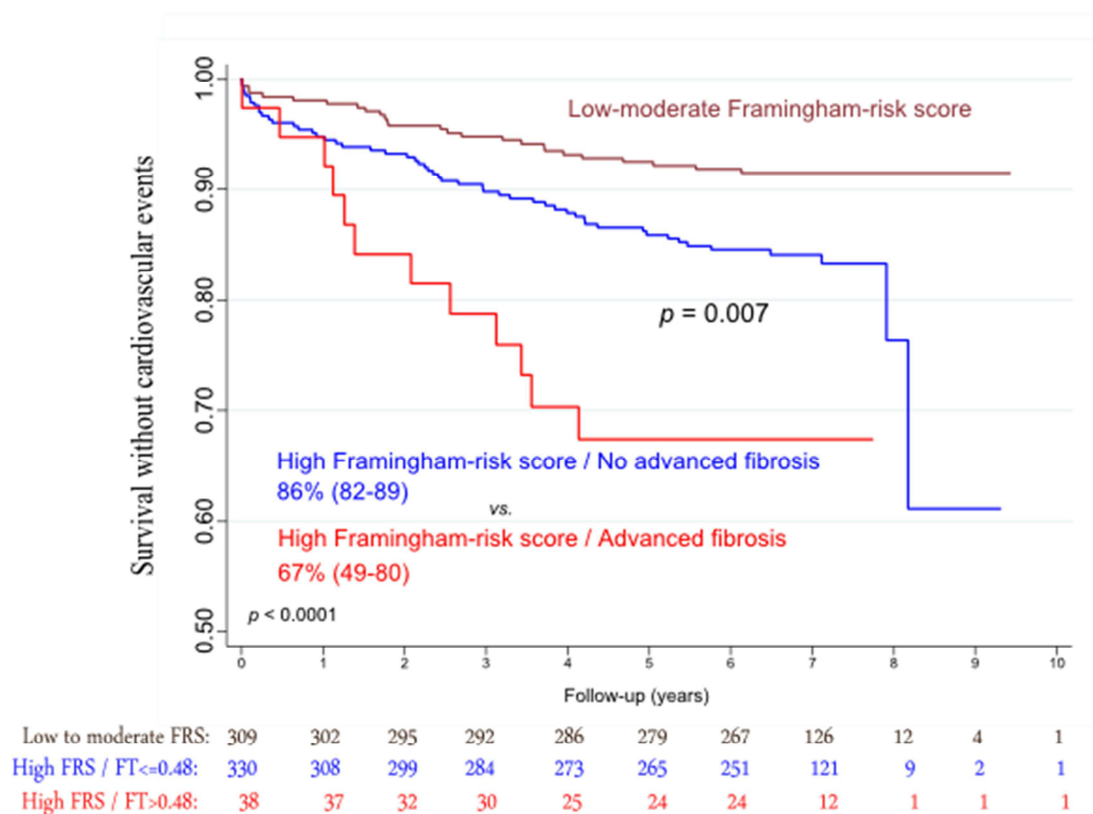
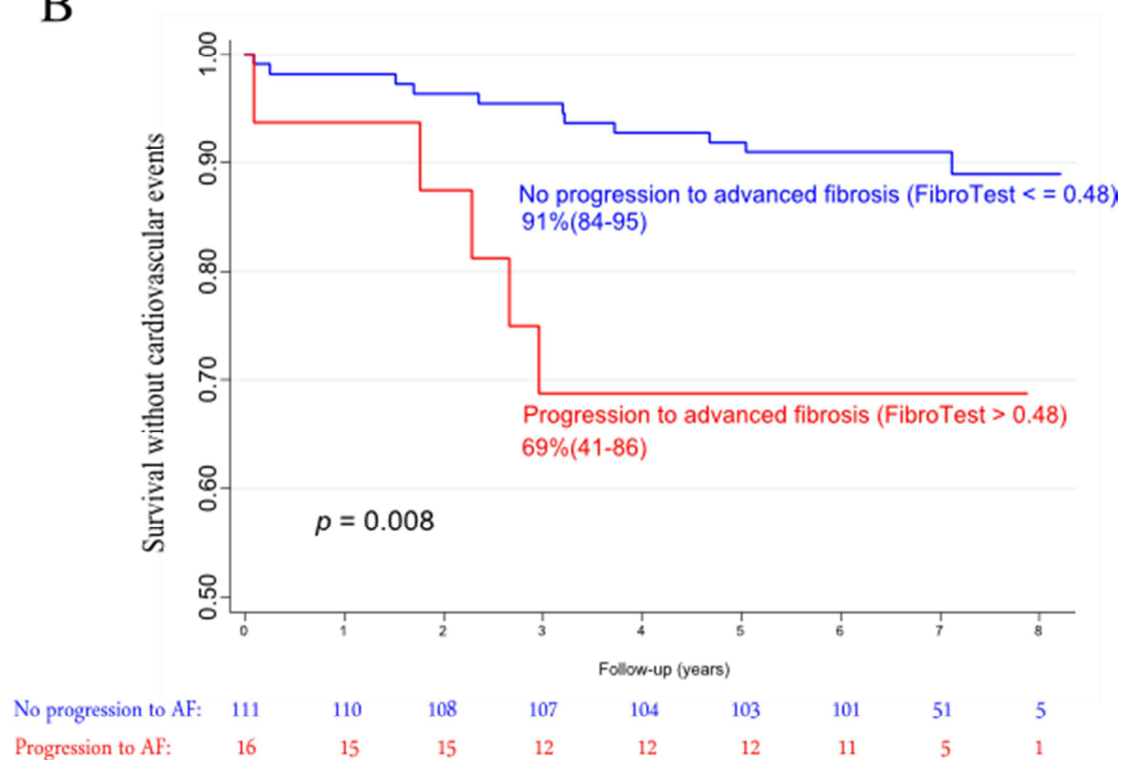


Figure 3.

A



B



Supplementary Tables

	Page
Table S1. Baseline characteristics of patients included from the two cohorts	1
Table S2. Specific causes of death in patients with type 2 diabetes	2
Table S3. Baseline characteristics of patients who died vs.who survived	3
Table S4. Overall mortality and cardiovascular morbidity/mortality rates, as per 1,000-person-year, according to liver biomarkers	4
Table S5. Overall and specific 10-years survivals according to liver biomarkers	5
Table S6. Overall survival compared to age and gender paired controls from the French population according to liver biomarkers	6
Table S7. Cardiovascular events in with type 2 diabetic patients from cohort 2	7
Table S8. Multivariate Cox model replacing FibroTest/SteatoTest by its components for the evaluation of overall survival and survival without cardiovascular outcomes	8
Table S9. Baseline characteristics of the patients who died during follow-up according to whether the cause of death was known or unknown	9
Table S10. Baseline characteristics of the patients according to whether their liver biomarkers were reevaluated or not	10
Table S11. Prediction of overall survival by liver biomarkers in a multivariate model adjusted for age, gender, blood hypertension, dyslipidemia, tobacco, alcohol consumption and treatment	11

Table S1. Baseline characteristics of patients included from the two cohorts

	Dyslipidemia (cohort 1, n=1635)	Type 2 diabetes (cohort 2, n=677)	p value
Age, years (a)	54 ± 13	59 ± 10	< 0.0001
Male gender, (c)	806 (49)	387 (57)	0.0006
Alcohol consumption, g/day (b)	0 (0-50)	0 (0-230)	0.65
Follow-up, years; (b)	12.7 (0.1-14.5)	6.8 (0.1-9.7)	< 0.0001
Liver biomarkers			
FibroTest score (a)	0.17 ± 0.12	0.20 ± 0.16	< 0.0001
Advanced fibrosis (F2F3F4)			
FibroTest > 0.48 (c)	45 (2.8)	50 (7.4)	< 0.0001
SteatoTest score (a)	0.43 ± 0.23	0.57 ± 0.20	< 0.0001
Severe steatosis (>32%)			
SteatoTest > 0.69 (c)	260 (16)	210 (31)	< 0.0001
Liver function tests			
ALT, U/L (a)	32 ± 21	32 ± 20	0.56
AST, U/L (a)	29 ± 16	27 ± 11	0.003
GGT, U/L (a)	39 ± 49	48 ± 60	< 0.0001
Cardiometabolic risk factors			
Systolic blood pressure, mmHg (a)	131 ± 16	128 ± 16	< 0.0001
Diastolic blood pressure, mmHg (a)	80 ± 9	71 ± 10	< 0.0001
Fasting glucose, mmol/L (a)	5.2 ± 1.3	9.3 ± 3.5	< 0.0001
Triglycerides, mmol/L (a)	1.6 ± 1.3	1.8 ± 1.9	0.0008
Total cholesterol, mmol/L (a)	6.4 ± 1.3	4.8 ± 1.1	< 0.0001
LDL cholesterol, mmol/L (a)	4.2 ± 1.2	2.7 ± 0.9	< 0.0001
HDL cholesterol, mmol/L (a)	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.4	< 0.0001
Metabolic syndrome (c)	404 (25)	317 (81)	< 0.0001
BMI, Kg/m² (a)	26.0 ± 4.5	30.0 ± 6.1	< 0.0001
Blood hypertension (c)	871 (53)	416 (63)	< 0.0001
Current smoking (c)	808 (49)	172 (25)	< 0.0001
Framingham Risk Score, % (a)	15 ± 13	23 ± 12	< 0.0001

Data expressed as (a) means ± standard deviation, (b) median (range) or (c) absolute (%). ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; BMI, body mass index;. Missing data (n): Metabolic syndrome (311), statin treatment (12).

Table S2. Specific causes of death in patients with type 2 diabetes

	n (%)
Cardiovascular-related death	23 (27.4)
– Ischemic heart disease	9 (39)
– Cardiac arrest	8 (35)
– Heart failure	5 (22)
– Cardiogenic shock	1 (4)
Non-liver cancer	22 (26.2)
– Lung cancer	7 (32)
– Pancreatic cancer	4 (19)
– Colon-rectal cancer	3 (15)
– Hematologic cancer	2 (9)
– Urinary cancer	2 (9)
– Breast cancer	1 (5)
– Genital cancer	1 (5)
– Head and neck cancer	1 (5)
– Neuroendocrine cancer	1 (5)
Liver-related death	7 (8.3)
– Hepatocellular carcinoma	4 (57)
– Cholangiocarcinoma	2 (29)
– Cirrhosis	1 (14)
Others or unknown	32 (38.1)

Patients with type 2 diabetes (n=911 in total) comprised patients with (n=644) and without (n=267) dyslipidemia.

Other causes of death were [10th International Classification of Diseases (n)] respiratory disease [J18.9 (5), W79.9 (2)]; natural death [R09.2 (3)]; sepsis [A41.9 (2)]; pancreatitis [K85(1)]; suicide [X70 (1)] and unknown [R99 (18)].

Table S3. Baseline characteristics of patients who died vs. who survived

	Alive (n=2140)	Dead (n= 172)	HR (95%CI)	p value
Age, years (a)	52 ± 13	61 ± 11	1.08 (1.07-1.10)	<0.0001
Male gender (c)	1081 (51)	112 (65)	1.85 (1.35-2.53)	0.0001
Alcohol consumption, g/day (b)	0 (0-230)	0 (0-50)	1.01 (0.99-1.02)	0.10
Liver biomarkers				
FibroTest score (a)	0.17 ± 0.13	0.25 ± 0.17	27.50 (12.54-60.28)	<0.0001
Advanced fibrosis (F2F3F4)				
FibroTest > 0.48 (c)	79 (3.7)	16 (9.3)	2.98 (1.79-4.99)	<0.0001
SteatoTest score (a)	0.47 ± 0.23	0.53 ± 0.23	4.11 (2.17-7.80)	<0.0001
Severe steatosis (>32%)				
SteatoTest > 0.69 (c)	420 (19.7)	50 (29.1)	1.86 (1.34-2.58)	0.0002
Liver function test				
ALT, U/L (a)	32 ± 21	31 ± 18	1.00 (0.99-1.01)	0.89
AST, U/L (a)	28 ± 15	30 ± 16	1.00 (0.99-1.00)	0.26
GGT, U/L (a)	40 ± 46	64 ± 102	1.004 (1.003-1.006)	<0.0001
Cardiometabolic risk factors				
Systolic blood pressure, mmHg (a)	129 ± 16	135 ± 18	1.02 (1.01-1.03)	<0.0001
Diastolic blood pressure, mmHg (a)	77 ± 10	78 ± 11	0.99 (0.98-1.01)	0.22
Fasting glucose, mmol/L (a)	6.3 ± 2.7	7.4 ± 4.2	1.18 (1.14-1.22)	<0.0001
Triglycerides, mmol/L (a)	1.6 ± 1.5	1.9 ± 2.1	1.08 (1.01-1.16)	0.02
Total cholesterol, mmol/L (a)	6.0 ± 1.5	5.8 ± 1.5	0.84 (0.75-0.95)	0.01
LDL cholesterol, mmol/L (a)	3.7 ± 1.4	3.6 ± 1.4	0.79 (0.69-0.89)	0.001
HDL cholesterol, mmol/L (a)	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4	0.92 (0.65-1.30)	0.63
HbA1c, % (a)	8.3 ± 1.7	9.2 ± 2.2	1.16 (1.06-1.26)	0.001
Insulin treatment (c)	229 (35)	30 (55)	2.17 (1.27-3.71)	0.005
Statin treatment (c)	1043 (49)	107 (63)	1.71 (1.25-2.33)	0.0007
Fibrate treatment (c)	326 (15)	31 (18)	1.11 (0.75-1.63)	0.62
Antiplatelet treatment (c)	198 (31)	29 (53)	2.47 (1.45-4.20)	0.0008
Metabolic syndrome (c)	653 (35)	68 (48)	2.13 (1.53-2.97)	<0.0001
BMI, Kg/m² (a)	27.1 ± 5.3	27.9 ± 5.6	1.05 (1.02-1.08)	0.0003
Dyslipidemia (c)	1890 (89)	155 (91)	0.63 (0.37-1.07)	0.10
Type 2 diabetes (c)	827 (39)	84 (49)	2.66 (1.95-3.67)	<0.0001
Blood hypertension (c)	1158 (54)	129 (76)	2.67 (1.88-3.79)	<0.0001
Current smoking (c)	894 (42)	86 (50)	1.21 (0.90-1.63)	0.22
Framingham-risk score, % (a)	17 ± 13	27 ± 14	1.05 (1.04-1.06)	<0.0001

Data expressed as (a) means ± standard deviation, (b) median (range) or (c) absolute (%). Differences were assessed by the time-dependent Cox proportional hazard model in univariate analysis. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; HbA1c, glycated hemoglobin; BMI, body mass index; HR, hazard ratio. Missing data (n): HbA1c (1629), insulin treatment (1614), statin treatment (12), fibrate treatment (25), antiplatelet treatment (1618), Metabolic syndrome (311).

Table S4. Overall mortality and cardiovascular morbidity/mortality rates, as per 1,000-person-year, according to liver biomarkers

	Overall mortality (per 1000-PY)	RR (95%CI)	<i>p</i> value	Cardiovascular mortality (per 1,000-PY)	RR (95%CI)	<i>p</i> value	Cardiovascular events (per 1,000-PY)	RR (95%CI)	<i>p</i> value
Total	7.00 (6.00-8.10)			1.38 (0.99-1.93)			21.98 (17.90-27.00)		
No advanced fibrosis (FibroTest ≤ 0.48)	6.55 (5.60-7.66)			1.34 (0.95-1.90)			20.39 (16.36-25.42)		
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	18.89 (11.57-30.84)	2.88 (1.72-4.82)	< 0.0001	2.36 (0.59-9.44)	1.76 (0.42-7.33)	0.43	45.20 (25.67-79.59)	2.22 (1.21-4.07)	0.008
No activity (ActiTest ≤ 0.17)	6.50 (5.42-7.79)			1.39 (0.94-2.05)			21.11 (16.46-27.08)		
Activity (ActiTest > 0.17)	8.28 (6.35-10.78)	1.27 (0.93-1.76)	0.14	1.35 (0.71-2.60)	0.98 (0.46-2.09)	0.95	24.11 (16.76-34.70)	1.14 (0.74-1.78)	0.56
No severe steatosis (SteatoTest ≤ 0.69)	6.01 (5.10-7.27)			1.00 (0.64-1.55)			20.54 (15.91-26.51)		
Severe steatosis (SteatoTest > 0.69)	11.0 (8.36-14.55)	1.81 (1.30-2.52)	0.0003	3.09 (1.83-5.21)	3.09 (1.56-6.12)	0.0006	25.70 (18.18-36.34)	1.25 (0.81-1.92)	0.31

CI, confidence interval; PY, person-year; RR, relative risk.

Table S5. Overall and specific 10-years survivals according to liver biomarkers

10-year Survival (95%CI)										
	n	Death	Overall Survival	p value	CV-related death	Survival without CV-related death	p value	Liver-related death	Survival without Liver-related death	p value
No advanced Fibrosis (FibroTest $\leq$ 0.48)	2217	156	94% (93-95)		32	98% (98-99)		1	99% (99-100)	
Advanced fibrosis (FibroTest > 0.48)	95	16	85% (75-91)	<0.0001	2	98% (91-99)	0.49	6	93% (85-97)	<0.0001
No activity (ActiTest $\leq$ 0.17)	1677	117	95% (93-96)		25	98% (98-99)		0	100%	
Activity (ActiTest > 0.17)	635	55	92% (90-94)	0.13	9	98% (97-99)	0.92	7	99% (97-99)	0.74
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest $\leq$ 0.69)	1842	122	95% (94-96)		20	99% (98-99)		4	99% (98-99)	
Severe steatosis ($\geq$ 32%) (SteatoTest > 0.69)	470	50	89% (85-92)	0.0002	14	96% (94-98)	0.0012	3	99% (97-99)	0.11

CI, confidence interval; CV, cardiovascular.

Table S6. Overall survival compared to age and gender paired controls from the French population according to liver biomarkers.

	n	death	Overall Survival % (95%CI)	Overall survival in age and gender paired French controls % (95%CI)	p value
Fibrosis (FibroTest)					
0.00-0.31 (F0)	1976	117	94.1 (93.0-95.1)	94.6 (94.4-95.0)	0.30
0.32-1.00 (F1F2F3F4)	336	55	83.6 (79.7-87.6)	90.1 (89.3-91.0)	< 0.01
≤ 0.48 (F0F1)	2217	156	93.0 (91.2-94.0)	94.1 (93.9-94.9)	0.04
> 0.48 (F2F3F4)	95	16	83.2 (75.5-90.8)	90.1 (89.4-92.5)	0.04
Steatosis (SteatoTest)					
0.00-0.38	922	54	94.1 (92.6-95.7)	94.1 (93.7-94.6)	0.98
0.39-0.58	585	45	92.3 (90.1-94.5)	93.8 (93.3-94.3)	0.18
0.59-1.00	805	73	90.1 (88.9-92.9)	93.9 (93.5-94.4)	< 0.01
≤ 0.69 (<32%)	1833	122	93.3 (92.4-95.8)	93.9 (93.6-94.2)	0.35
> 0.69 (>32%)	470	50	89.4 (86.6-92.2)	94.3 (93.8-94.8)	< 0.001
All	2312	172	92.6 (91.5-93.6)	94.0 (93.7-94.3)	0.01

Overall survival in the entire study population (n=2312) was compared with age- and gender-paired healthy controls from the French population, based on official published census tables (Vallin J, Meslé F. Paris: Institut National d'Etudes Démographiques, 2001).

Table S7. Cardiovascular events in with type 2 diabetic patients from cohort 2

Lethal cardiovascular events; n (%)	n=19
Myocardial infarction (I21.9) / cardiac arrest (I46.9)	10 (8)
Heart failure (I50.1)	8 (6)
Ischemic heart disease (I25.9) associated with arrhythmia (I49.9)	1 (1)
Non-lethal cardiovascular events; n (%)	n=114
Myocardial infarction	22 (16)
Unstable angina	19 (14)
Coronary by-pass	10 (8)
Coronary angioplasty	51 (38)
Stroke	12 (9)
Total	n=133
7-year cardiovascular events incidence [Kaplan-Meier %]	15% (95%CI 11.9-18.2)

During a median follow-up of 7 years, 91 (13.4%) type-2 diabetic patients from cohort 2, developed 133 cardiovascular events.

Table S8. Multivariate Cox model replacing FibroTest/SteatoTest by its components for the evaluation of overall survival and survival without cardiovascular outcomes

	Overall Survival HR (95%CI)	<i>p</i> value	Survival without CV-related death HR (95%CI)	<i>p</i> value	Survival without CV events HR (95%CI)	<i>p</i> value
Alpha-2 macroglobulin	1.259 (0.993-1.596)	0.06	1.445 (0.870-2.40)	0.16	1.350 (0.995-1.833)	0.06
Apolipoprotein A1	0.890 (0.506-1.563)	0.68	1.675 (0.484-5.800)	0.42	0.801 (0.314-2.038)	0.64
Haptoglobin	1.541 (1.189-1.998)	0.0008	1.386 (0.782-2.455)	0.26	1.427 (1.037-1.963)	0.03
GGT	1.004 (1.002-1.006)	<0.0001	1.004 (0.999-1.008)	0.11	1.003 (0.999-1.006)	0.11
Total bilirubin	0.998 (0.959-1.040)	0.94	0.959 (0.861-1.068)	0.44	1.005 (0.953-1.060)	0.85
Age	1.079 (1.062-1.097)	<0.0001	1.050 (1.014-1.087)	0.01	1.027 (1.005-1.050)	0.02
Male gender	2.100 (1.497-2.947)	<0.0001	2.229 (1.055-4.708)	0.04	2.453 (1.504-4.001)	<0.0001
ALT	0.995 (0.986-1.004)	0.27	0.975 (0.948-1.004)	0.09	0.995 (0.982-1.007)	0.39
Total cholesterol	0.996 (0.880-1.128)	0.95	1.044 (0.794-1.371)	0.78	1.095 (0.893-1.344)	0.38
Triglycerides	0.985 (0.888-1.094)	0.78	1.094 (0.965-1.239)	0.16	1.054 (0.970-1.144)	0.21
Fasting glucose	1.128 (1.074-1.185)	<0.0001	1.132 (1.032-1.241)	0.01	1.035 (0.976-1.096)	0.25
BMI	1.024 (0.992-1.057)	0.14	1.088 (1.035-1.144)	<0.0001	1.019 (0.984-1.054)	0.29
Model combining FibroTest and Apolipoprotein A1						
FibroTest	36.638 (16.203-82.843)	<0.0001	12.820 (1.700-96.654)	0.01	4.495 (1.423-14.199)	0.01
Apolipoprotein A1	1.814 (1.115-2.950)	0.02	1.984 (0.677-5.815)	0.21	0.839 (0.367-1.920)	0.68

GGT, gamma-glutamyltransferase ALT, alanine transaminase; BMI, body mass index; CV, cardiovascular; HR, hazard ratio; CI, confidence interval

Table S9. Baseline characteristics of the patients who died during follow-up according to whether the cause of death was known or unknown

	Known death cause (n=118)	Unknown death cause (n=54)	p value
Age, years (a)	63 ± 11	65 ± 11	0.28
Male gender (c)	75 (63)	37 (69)	0.48
Alcohol consumption, g/day (b)	0 (0-50)	0 (0-40)	0.85
Liver biomarkers			
FibroTest score (a)	0.24 ± 0.17	0.27 ± 0.16	0.30
Advanced fibrosis (F2F3F4)			
FibroTest > 0.48 (c)	11 (9.2)	5 (9.3)	0.99
SteatoTest score (a)	0.54 ± 0.24	0.50 ± 0.22	0.28
Severe steatosis (>32%)			
SteatoTest > 0.69 (c)	36 (30.3)	14 (25.9)	0.56
Liver function tests			
ALT, U/L (a)	32 ± 20	29 ± 14	0.29
AST, U/L (a)	31 ± 18	28 ± 7	0.34
GGT, U/L (a)	65 ± 105	61 ± 95	0.85
Cardiometabolic risk factors			
Systolic blood pressure, mmHg (a)	134 ± 18	138 ± 19	0.15
Diastolic blood pressure, mmHg (a)	76 ± 11	80 ± 10	0.03
Fasting glucose, mmol/L (a)	7.7 ± 4.1	6.7 ± 4.3	0.13
Triglycerides, mmol/L (a)	2.0 ± 2.4	1.5 ± 1.0	0.18
Total cholesterol, mmol/L (a)	5.7 ± 1.4	6.1 ± 1.6	0.15
LDL cholesterol, mmol/L (a)	3.4 ± 1.3	3.9 ± 1.5	0.02
HDL cholesterol, mmol/L (a)	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	0.90
Metabolic syndrome (c)	52 (54)	16 (34)	0.02
BMI, Kg/m² (a)	28.4 ± 6.0	26.7 ± 4.3	0.06
Dyslipidemia (c)	104 (88)	52 (96)	0.08
Type 2 diabetes (c)	65 (55)	19 (35)	0.02
Blood hypertension (c)	87 (75)	42 (78)	0.63
Current smoking (c)	59 (49)	27 (50)	0.96
Framingham-risk Score, % (a)	27 ± 14	28 ± 13	0.78

Unknown cause of death corresponded to the 10th International Classification of Diseases code: R99

Data expressed as (a) means ± standard deviation, (b) median (range) or (c) absolute (%). ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; BMI, body mass index; . Missing data (n): Metabolic syndrome (29).

Table S10. Baseline characteristics of the patients according to whether their liver biomarkers were reevaluated or not

Data expressed as (a): means $\pm$ standard deviation, (b): median (range) or (c): absolute (%). ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; GGT, gamma-glutamyltransferase; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; BMI, body mass index. Missing data (n):

	No reevaluation(n=485)	Reevaluation (n=136)	p value
Age, years (a)	58 $\pm$ 11	57 $\pm$ 9	0.21
Male gender (c)	267 (55)	79 (58)	0.53
Alcohol consumption, g/day (b)	0 (0-230)	0 (0-80)	0.08
Follow-up, years (b)	6.9 (0.8-9.7)	7.0 (6.0-8.2)	0.08
Liver biomarkers			
FibroTest score (a)	0.19 $\pm$ 0.16	0.17 $\pm$ 0.14	0.16
Advanced fibrosis (F2F3F4)			
FibroTest > 0.48 (c)	31 (6.4)	9 (6.6)	0.92
SteatoTest score (a)	0.56 $\pm$ 0.20	0.55 $\pm$ 0.21	0.57
Severe steatosis (>32%)			
SteatoTest > 0.69 (c)	143 (30)	45 (33)	0.44
Liver function tests			
ALT, U/L (a)	32 $\pm$ 19	34 $\pm$ 21	0.20
AST, U/L (a)	26 $\pm$ 10	28 $\pm$ 12	0.11
GGT, U/L (a)	45 $\pm$ 48	43 $\pm$ 57	0.71
Cardiometabolic risk factors			
Systolic blood pressure, mmHg (a)	128 $\pm$ 16	125 $\pm$ 15	0.08
Diastolic blood pressure, mmHg (a)	71 $\pm$ 10	70 $\pm$ 12	0.47
Fasting glucose, mmol/L (a)	9.2 $\pm$ 3.3	9.2 $\pm$ 3.5	0.95
Triglycerides, mmol/L (a)	1.79 $\pm$ 1.85	1.62 $\pm$ 1.30	0.31
Total cholesterol, mmol/L (a)	4.9 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 1.0	0.02
LDL cholesterol, mmol/L (a)	2.7 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.9	0.04
HDL cholesterol, mmol/L (a)	1.4 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	0.62
Metabolic syndrome (c)	252 (82)	65 (79)	0.64
BMI, Kg/m² (a)	29.8 $\pm$ 6.1	30.2 $\pm$ 6.1	0.58
Dyslipidemia (c)	278 (58)	93 (68)	0.03
Blood hypertension (c)	297 (62)	76 (57)	0.26
Current smoking (c)	120 (25)	33 (24)	0.91
Framingham Risk Score, % (a)	23 $\pm$ 12	21 $\pm$ 10	0.04
Metabolic syndrome (286).			

Table S11. Prediction of overall survival by liver biomarkers in a multivariate model adjusted for age, gender, blood hypertension, dyslipidemia, tobacco, alcohol consumption and treatment

	Overall Survival HR (95% CI)	<i>p</i> value
Treated vs. non-treated ; n=1447		
No advanced fibrosis (F0F1) (FibroTest ≤ 0.48)	Reference	
Advanced fibrosis (F2F3F4) (FibroTest > 0.48)	2.16 (1.24-3.77)	0.007
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.58 (1.07-2.33)	0.02
Statin treatment; n=2165		
No advanced fibrosis (F0F1) (FibroTest ≤ 0.48)	Reference	
Advanced fibrosis (F2F3F4) (FibroTest > 0.48)	1.82 (1.07-3.10)	0.03
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.59 (1.13-2.26)	0.008
Antiplatelet treatment; n=561		
No advanced fibrosis (F0F1) (FibroTest ≤ 0.48)	Reference	
Advanced fibrosis (F2F3F4) (FibroTest > 0.48)	2.12 (1.03-4.38)	0.04
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.44 (0.79-2.64)	0.23
Insulin treatment; n=564		
No advanced fibrosis (F0F1) (FibroTest ≤ 0.48)	Reference	
Advanced fibrosis (F2F3F4) (FibroTest > 0.48)	2.05 (1.01-4.21)	0.04
No severe steatosis (<32%) (SteatoTest ≤ 0.69)	Reference	
Severe steatosis (≥32%) (SteatoTest > 0.69)	1.59 (0.86-2.92)	0.14

CI, confidence interval; HR, hazard-ratio

V-6. Discussion

Cette étude a démontré la valeur pronostique de biomarqueurs des lésions hépatiques chez les patients ayant un diabète de type 2 ou une dyslipidémie, deux pathologies souvent associés à la NAFLD. Notre hypothèse de départ était que la fibrose du foie serait un facteur de risque majeur de mortalité hépatique et que la stéatose pourrait être un marqueur de l'athérosclérose, associée à la maladie cardiovasculaire. En effet, les biomarqueurs de fibrose et de stéatose, FibroTest et SteatoTest, nous ont permis de mieux séparer les risques de complications hépatiques et cardiovasculaires. Nous avons aussi rapporté la valeur pronostique du FibroTest pour la prédiction des complications cardiovasculaires chez les diabétiques de type 2. La présence d'une fibrose avancée, présumé par ce biomarqueur a amélioré la valeur pronostique du score de Framingham. En plus, la progression de la fibrose hépatique a été associée au risque plus élevé d'incidence de complications cardiovasculaires.

La NAFLD semble être associée à un risque plus élevé de mortalité globale. Cependant, d'autres études contredisent ces résultats, vraisemblablement parce qu'aucune de ces études n'avait utilisé de quantification de la fibrose ou de la stéatose. Dans trois études, la présence d'une NAFLD n'a pas été associée à un risque plus élevé de mortalité, sauf dans une sous population de patients âgés de plus de 45 ans. (Dunn, Xu et al. 2008; Lazo, Hernaez et al. 2011; Kim, Kim et al. 2013) En revanche, la NAFLD a été associée à la mortalité globale dans cinq autres études, y compris dans une cohorte de patients diabétiques de type 2. (Adams, Lymp et al. 2005; Ruttman, Brant et al. 2005; Ong, Pitts et al. 2008; Calori, Lattuada et al. 2011). Dans la plupart de ces études le diagnostic de NAFLD était basé sur des méthodes d'imagerie ou d'altération des enzymes hépatiques. L'échographie abdominale n'est pas un marqueur performant, le seuil de sensibilité étant de 30% des hépatocytes (Saadeh, Younossi et al. 2002). Les transaminases ne sont pas précises pour l'estimation de la fibrose, ce qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires (Canbakan, Senturk et al. 2010).

Plusieurs études ont rapporté que la NAFLD était associée à la mortalité globale et cardiovasculaire. Une équipe italienne a rapporté que FLI, un biomarqueur d'estimation de la stéatose hépatique, était associé à la mortalité globale et cardiovasculaire (Calori, Lattuada et al. 2011). Nos résultats sont en accord avec ces données. Dans notre cohorte, la présence d'une stéatose sévère (>32% des hépatocytes), estimé par le SteatoTest, était prédictive de la mortalité globale et cardiovasculaire indépendamment des facteurs métaboliques. Les cancers non-hépatiques étaient la cause principale de mortalité, responsables d'environ 30% des cas, suivie par les causes cardiovasculaires (20%). La maladie cardiovasculaire était la cause principale de mortalité (27% des décès) chez les patients diabétiques de type 2.

Précédemment, l'équipe avait montré la valeur pronostique du FibroTest pour prédire la mortalité globale et d'origine hépatique dans diverses maladies chroniques du foie (Ngo, Munteanu et al. 2006; Naveau, Gaude et al. 2009; de Ledinghen, Vergniol et al. 2013). Cette étude elargit la valeur pronostique du FibroTest à la prédiction de la mortalité globale et d'origine hépatique chez les patients ayant un diabète de type 2 et/ou une dyslipidémie. Plusieurs auteurs ont rapporté la valeur pronostique de plusieurs biomarqueurs d'estimation de la fibrose hépatique, comme le NFS, l'APRI et le FIB-4, dans la NAFLD. (Kim, Kim et al. 2013) Ces auteurs n'ont pas trouvé l'association entre stéatose et mortalité globale. En revanche, les patients ayant une NAFLD associée à la fibrose hépatique avaient un risque de mortalité plus élevée que ceux ayant une stéatose simple non fibrosante. Nos résultats renforcent l'hypothèse d'une influence de la fibrose du foie sur la mortalité globale et d'origine hépatique.

Les causes d'origine hépatique ont été responsables d'environ 4% des décès (4 carcinomes hépatocellulaires, 2 cholangiocarcinomes intra hépatiques, 1 complication de cirrhose). Le faible nombre d'événements hépatiques pourrait être un facteur limitant pour l'analyse multivariée. Cependant, dans notre étude, la présence d'une fibrose avancée était un facteur de risque de mortalité indépendant des facteurs métaboliques confondants. Dans

l'étude asiatique menée par Kim et al, la fibrose hépatique pourrait être surestimée par les biomarqueurs à cause d'une activité nécrotico-inflammatoire car le NFS, l'APRI et le FIB-4 utilisent les enzymes hépatiques dans ses formules pour estimer la fibrose du foie. Le FibroTest ne prend pas en compte les transaminases pour son calcul, de sorte que l'estimation de la fibrose par ce biomarqueur n'est jamais influencée par l'inflammation hépatique.

Plusieurs études ont associé la NAFLD à la maladie coronarienne (Wong, Wong et al. 2011) ainsi qu'à la présence de marqueurs d'athérosclérose (Kim, Choi et al. 2012; Siddiqui, Sterling et al. 2013). Pourtant, jusqu'à présent, il restait inconnu si l'association entre stéatose hépatique et les complications cardiovasculaires était toujours significative après l'ajustement sur l'estimation de la fibrose du foie.

Notre étude a corréla la fibrose hépatique à l'incidence des événements cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type 2. Nous avons également démontré que la progression de la fibrose vers la fibrose avancée était associée à une incidence plus élevée de complications cardiovasculaires. La présence d'une fibrose avancée (F2F3F4), estimée par le FibroTest, restait prédictive de la survie à 5 ans sans complication cardiovasculaire chez ces patients indépendamment des facteurs confondants comme les facteurs métaboliques, la gravité du diabète, le traitement en cours ou le score de Framingham.

Malgré l'évaluation d'une population française, nous avons choisi de confronter les biomarqueurs de lésion hépatique au score Framingham au lieu d'utiliser le score Européen prédictif de risque de complications cardiovasculaires, appelé SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*) et recommandé par la Société Européenne de Cardiologie. Le SCORE a été validé sur un large ensemble de données issues d'études européennes prospectives et prévoit les événements d'athérosclérose coronarienne fatals sur une période de 10 ans. Le score de Framingham et le modèle SCORE utilisent des paramètres similaires à l'exception de l'histoire d'un diabète inclus uniquement dans le score de Framingham. Cependant, le score de Framingham est le score prédictif cardiovasculaire le plus validé au monde, validé par plus de

(<http://www.framinghamheartstudy.org/biblio/index.html>). Le score de Framingham a également été validé pour prédire les complications cardiovasculaires dans la NAFLD (Treeprasertsuk, Leverage et al. 2012). Le suivi médian de nos patients diabétiques de type 2 a été de 7 ans. Le modèle SCORE ne s'applique qu'au risque cardiovasculaire à 10 ans, alors que le score de Framingham s'applique à toute période de suivi. Selon les directrices de la Société de Européenne de Cardiologie le calcul du risque cardiovasculaire par le modèle SCORE ne s'applique pas aux patients ayant un diabète de type 2 ou un diabète de type 1 accompagné d'une microalbuminurie ou de très hauts niveaux de facteurs de risque (Catapano, Reiner et al. 2011).

Nous avons confirmé la valeur pronostique du score de Framingham pour la prédiction des événements cardiovasculaires chez les patients atteints de diabète de type 2. L'étude a également confirmé l'association du mauvais contrôle glycémique dans le diabète, mesuré par l'hémoglobine glyquée (HbA1c), à la mortalité globale. L'information sur la présence d'une fibrose avancée, estimée par le FibroTest, a été capable d'améliorer la performance du score de Framingham, en particulier chez les patients à haut risque de complications cardiovasculaires, ceux qui avaient un score de Framingham $\geq 20\%$. Les patients à haut risque cardiovasculaire par le score de Framingham qui n'avaient pas de fibrose avancée avaient une survie sans complication cardiovasculaire similaire à ceux ayant un score de Framingham $< 20\%$, à bas risque cardiovasculaire. Ces résultats suggèrent que la fibrose hépatique pourrait jouer un rôle décisif dans l'athérosclerose. L'hypothèse d'une relation entre la fibrose du foie comme un facteur impactant dans la maladie cardiovasculaire a été renforcé par l'incidence plus élevée de complications cardiovasculaires chez les patients qui ont progressés de la fibrose minime à la fibrose avancée, estimé par le FibroTest, pendant un suivi médian de 7 ans.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la relation entre la fibrose hépatique et le processus d'athérosclérose. La pathogénèse de la NAFLD/NASH avec les "*multiples hits*" pourrait partager une voie biologique similaire à celle de l'athérosclérose. La progression de la stéatose vers la NASH, et par conséquent l'installation d'une fibrose hépatique, entraîne l'activation des cytokines proinflammatoires et athérogéniques. Cette cascade inflammatoire pourrait jouer un rôle important dans la formation des plaques intra-artérielles qui pourrait provoquer une incidence plus élevée des complications cardiovasculaires chez les patients qui progressent la maladie hépatique. Enfin, les concentrations sériques d'Apo-A1, un des composants du FibroTest, pourrait expliquer l'association entre le biomarqueur et les complications cardiovasculaires. L'Apo-A1 est une protéine spécifique du foie et le principal constituant des lipoprotéines de haute densité (HDL), un facteur protecteur de complications cardiovasculaires. La progression de la fibrose hépatique est associée à une réduction de la concentration sérique de l'Apo-A1. Donc, les patients ayant une fibrose avancée auraient un risque plus élevé de complications cardiovasculaires en raison d'une concentration sérique réduite du HDL-cholesterol. En revanche, nous avons remplacé les composants du FibroTest-SteatoTest dans un modèle proportionnelle de Cox et l'Apo-A1 ne sort pas comme un paramètre associé aux événements cardiovasculaires. En plus, nous avons ajusté le modèle par l'Apo-A1 et le FibroTest reste toujours comme un facteur de risque indépendant.

Les points forts de notre étude comprennent la taille, la longue durée du suivi des patients, la collecte de données sur la mortalité et la confrontation des biomarqueurs hépatiques au score de Framingham. Notre échantillon comprenait plus de 2,000 patients suivis pendant une période médiane de 12 ans. Les données sur la mortalité ont été recueillies auprès du centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDc), associé à l'institut national de la santé et de la recherche médical (Inserm). Le CépiDc informe les causes de mortalités primaires et secondaires à partir d'une analyse systématique des certificats de décès en utilisant la classification internationale des maladies. Cette collecte des

données de mortalité par un centre national spécialisé et indépendant de l'équipe de l'étude a évité la classification incorrecte des causes de décès. Cette démarche nous a permis d'évaluer la performance des biomarqueurs contre une référence incontestable comme le décès. Le FibroTest a pu être associé au score de Framingham, le score le plus validé pour prédire les complications cardiovasculaires. Malgré le besoin d'une validation indépendante, cette information sur le stade de fibrose du foie a pu améliorer la performance du score de Framingham pour la prédiction des complications cardiovasculaires chez les patients diabétiques de type 2.

La population de l'étude ne se limite pas aux critères de définition de la NAFLD mais englobe un plus large spectre des patients ayant des maladies métaboliques, comme le diabète et la dyslipidémie. En accord avec les données précédemment publiées, nous avons constaté l'impact du contrôle du diabète, par la mesure de l'HbA1c, sur la mortalité globale (Currie, Peters et al. 2010), la forte prévalence de la stéatose hépatique chez les patients diabétiques de type 2 (47%)(Williamson, Price et al. 2011) et le lien entre la présence de facteurs métaboliques et de la fibrose avancée (Grattagliano, Ubaldi et al. 2013).

Les limites de l'étude ont été le taux relativement élevé de causes inconnues de mortalité, le recueil retrospectif des complications cardiovasculaires des patients diabétiques de la cohorte 2 et l'effectif relativement faible des patients soumis à l'évaluation prospective de la progression de la fibrose hépatique pendant le suivi total. Malgré la collecte des données sur la mortalité par un centre de recherche spécialisé nous avons eu 54 patients décédés avec une cause de mortalité décrite dans le certificat de décès comme inconnue ou non spécifique (codage R99). Cependant, les principaux facteurs de risque associés à la mortalité n'étaient pas significativement différents entre les patients ayant une cause de mortalité connue par rapport à ceux qui n'avaient pas la cause de décès connue.

Le même investigateur a été responsable de la recherche retrospective des données de les diabétiques de type 2. Ces données ont été recueillies par un clinicien expérimenté qui a

réalisé une recherche approfondie des dossiers médicaux, contacté les patients, leurs familles et leurs médecins traitants. En plus, une révision systématique de la base de données du Service de Cardiologie Interventionnelle du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière a été réalisée pour identifier les possibles angioplasties avec pose de stent dans cette population de patients. Les patients diabétiques ont été invités par courrier à revenir au Service d'Hépatogastroentérologie pour une hospitalisation de jour afin de réaliser un nouveau bilan pour évaluer la fibrose hépatique par des marqueurs non-invasifs. Notre taux de réponse positive a été d'environ 25% après l'envoi de deux convocations dans une période de 6 mois. Cette relative faible adhésion à une ré-évaluation de la fibrose hépatique pourrait être expliquée car il s'agissait en majorité de patients qui avaient une stéatose hépatique avec des transaminases normales, rassurés par leur diabétologue ou leur médecin traitant. Malgré le faible effectif de patients ré-investigués pour l'évaluation de la progression de la fibrose, les principaux facteurs associés à la progression de la fibrose du foie ne différaient pas entre les sujets ré-évalués par rapport à ceux qui n'ont pas eu une nouvelle évaluation par des biomarqueurs.

Le recrutement de patients suivis dans un centre tertiaire peut influencer les résultats surtout par rapport à la mortalité. La grande majorité des patients était sous traitement prophylactique pour éviter les complications cardiovasculaires comme l'anti-agrégant plaquettaire et les statines. En plus, les patients suivis dans le Service de Diabétologie du groupe hospitalier semblaient avoir un diabète de type 2 sévère et mal contrôlé car environ 35% des patients étaient traités par insuline et l'HbA1c moyenne était de 8.0%. Le détail sur les traitements spécifiques des patients n'était entièrement disponible que pour les patients diabétiques de la cohorte 2. Par conséquent, nous n'avons pas pu inclure tous ces paramètres dans l'analyse multivariée pour la mortalité globale de l'ensemble des patients. Cependant, nous avons confirmé la valeur pronostique de biomarqueurs dans toute la cohorte par des modèles multivariés qui comprenaient les différentes formes de traitements. En plus, les

analyses multivariées du sous-groupe de diabétiques provenant de la cohorte 2 ont été ajusté par le traitement complet.

En conclusion, les biomarqueurs des lésions hépatiques, le FibroTest et le SteatoTest, sont d'un intérêt particulier chez les patients qui ont des maladies métaboliques. Ces biomarqueurs sont prédictifs de la mortalité globale chez les patients ayant un diabète de type 2 et/ou une dyslipidémie. Le FibroTest et le SteatoTest sont également prédictifs, respectivement, de la mortalité d'origine hépatique et cardiovasculaire indépendamment des facteurs confondants. La présence d'une fibrose avancée, estimée par le FibroTest a été associée à l'incidence de complications cardiovasculaires chez les diabétiques de type 2 et l'information obtenue par ce biomarqueur pourrait améliorer la performance du score de Framingham pour prédire des événements cardiovasculaires. Enfin, la progression de la fibrose, présumée par le FibroTest, a été corrélée à un risque plus élevé de complications cardiovasculaires.

Chapitre VI - Conclusions et perspectives

Plusieurs méthodes non invasives ont été développées pour remplacer la biopsie hépatique au cours des dix dernières années. De plus en plus, ces méthodes sont utilisées en pratique clinique pour estimer les principales lésions tissulaires hépatiques comme la fibrose, l'activité nécrotico-inflammatoire ou la stéatose. Cependant, la bonne utilisation d'une méthode non invasive nécessite de bien connaître ses principes techniques, ses limites et sa précision dans les différentes situations possibles.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse m'ont permis de montrer les limites de certaines méthodes ainsi que l'utilité de biomarqueurs, comme le FibroTest et le SteatoTest, pour prédire la mortalité globale, d'origine hépatique ou cardiovasculaire, chez les sujets ayant un diabète de type 2 et/ou une dyslipidémie. Ce dernier travail a aussi confirmé l'association entre NAFLD et maladie cardiovasculaire.

L'étude sur la reproductibilité de l'élastométrie a permis de mettre en évidence une variabilité inter-observateur importante de la méthode. L'interprétation des mesures de l'élasticité du foie par élastométrie doit prendre en compte cette limite. Du fait d'une telle variabilité, cette méthode ne peut pas notamment à ce jour remplacer l'endoscopie digestive à la recherche de varices oesophagiennes. Pour contourner la difficulté que soulève la variabilité de la méthode, une possibilité est de l'utiliser de préférence pour un suivi longitudinal, en faisant toujours appel au même opérateur expérimenté. Baser la prise en charge et la décision clinique ou thérapeutique sur une seule mesure de l'élasticité du foie n'est en revanche pas recommandé.

Ce travail nous a aussi permis de montrer l'influence de l'inflammation et de la stéatose sur l'estimation de la fibrose par le test APRI et l'élastométrie. La prise en compte des transaminases dans le test APRI entraîne une surestimation de la fibrose hépatique liée à l'activité nécrotico-inflammatoire, tandis que l'expression des transaminases en multiple de la

normale entraîne une variabilité du test. La présence d'une stéatose hépatique, estimée par le SteatoTest et trois autres marqueurs non invasifs, a été identifiée comme un facteur indépendant associé à la surestimation de la fibrose du foie par l'élastométrie chez les sujets ayant un diabète de type 2. D'autres études incluant une évaluation par biopsie du foie, ou par IRM, pourraient permettre de confirmer ces conclusions.

Enfin, l'étude sur la valeur pronostique du FibroTest et du SteatoTest chez des patients ayant des désordres métaboliques, a montré que l'utilisation de ces biomarqueurs pouvaient représenter une avancée majeure pour l'estimation des complications graves à long terme. Les avantages des ces biomarqueurs sont l'applicabilité et la capacité d'évaluer séparément des lésions hépatiques principales, comme la stéatose et la fibrose. Le FibroTest et le SteatoTest pourraient être utilisés pour identifier en présence de fibrose avancée et/ou de stéatose sévères, les patients à haut risque d'évènements graves d'ordre hépatique ou cardio-métabolique. L'estimation de la fibrose par le FibroTest pourrait aussi en absence de fibrose, exclure le risque de complications hépatiques à 10 ans chez les patients ayant des transaminases élevées. D'autres études doivent être réalisées pour bien établir à l'avenir la relation entre la fibrose hépatique et l'athérosclérose. L'amélioration de la performance du score de Framingham par son association au FibroTest ouvre la voie à l'élaboration d'un index pronostique "cardio-hépatique" chez les patients ayant une maladie cardio-métabolique.

Chapitre VII - References 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.
- (2009). "Heart Disease and Stroke Statistics - 2009 Update.", from <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3000090>.
- (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): 908-943.
- (NCHS), N. C. f. H. S. (2009). "Compressed mortality file: underlying cause of death, 1979 to 2005.", from <http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>.
- 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.
- Adams, L. A., S. Harmsen, et al. (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study." Am J Gastroenterol **105**(7): 1567-1573.
- 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): 113-121.
- 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): 180-187.
- Akabame, S., M. Hamaguchi, et al. (2008). "Evaluation of vulnerable coronary plaques and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by 64-detector multislice computed tomography (MSCT)." Circ J **72**(4): 618-625.

- Amarapurka, D. N., A. D. Amarapurkar, et al. (2006). "Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with diabetes: predictors of liver fibrosis." Ann Hepatol 5(1): 30-33.
- Anastasiou, J., A. Alisa, et al. (2010). "Noninvasive markers of fibrosis and inflammation in clinical practice: prospective comparison with liver biopsy." Eur J Gastroenterol Hepatol 22(4): 474-480.
- Angulo, P. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." N Engl J Med 346(16): 1221-1231.
- Angulo P, B. E., Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills and B. F. PR, Haflidadottir S, Day CP, George J (2013). "Simple Non-Invasive Systems Predict Long-Term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Gastroenterology.
- 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): 846-854.
- 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): 380-384.
- Arslan, U., S. Turkoglu, et al. (2007). "Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery disease." Coron Artery Dis 18(6): 433-436.
- Assy, N., K. Kaita, et al. (2000). "Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients." Dig Dis Sci 45(10): 1929-1934.
- Bacon, B. R., P. C. Adams, et al. (2011). "Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases." Hepatology 54(1): 328-343.
- Bacq, Y., Y. Schillio, et al. (1993). "[Decrease of haptoglobin serum level in patients with chronic viral hepatitis C]." Gastroenterol Clin Biol 17(5): 364-369.

- 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.
- Bedossa, P., D. Dargere, et al. (2003). "Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C." Hepatology **38**(6): 1449-1457.
- Bedossa, P., C. Poitou, et al. (2012). "Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients." Hepatology **56**(5): 1751-1759.
- Bedossa, P., T. Poynard, et al. (1989). "Apolipoprotein AI is a serum and tissue marker of liver fibrosis in alcoholic patients." Alcohol Clin Exp Res **13**(6): 829-833.
- Bellentani, S., G. Saccoccio, et al. (2000). "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy." Ann Intern Med **132**(2): 112-117.
- 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.
- Bhatia, L. S., N. P. Curzen, et al. (2012). "Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor?" Eur Heart J **33**(10): 1190-1200.
- Bjorntorp, P. (1990). "'Portal' adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes." Arteriosclerosis **10**(4): 493-496.
- Bosma, P. J., J. R. Chowdhury, et al. (1995). "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome." N Engl J Med **333**(18): 1171-1175.
- Bota, S., H. Herkner, et al. (2013). "Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis." Liver Int **33**(8): 1138-1147.
- Boursier, J., V. de Ledinghen, et al. (2013). "Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C." J Gastroenterol.
- Boursier, J., A. Konate, et al. (2008). "Reproducibility of liver stiffness measurement by ultrasonographic elastometry." Clin Gastroenterol Hepatol **6**(11): 1263-1269.

- Boza, C., A. Riquelme, et al. (2005). "Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass." Obes Surg **15**(8): 1148-1153.
- 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): 1387-1395.
- 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): 2467-2474.
- Budoff, M. J., S. Achenbach, et al. (2006). "Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on Cardiac Imaging, Council on Clinical Cardiology." Circulation **114**(16): 1761-1791.
- Bugianesi, E., N. Leone, et al. (2002). "Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **123**(1): 134-140.
- Bugianesi, E., A. J. McCullough, et al. (2005). "Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease." Hepatology **42**(5): 987-1000.
- 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): 1261-1268.
- Cales, P., F. Oberti, et al. (2005). "A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis." Hepatology **42**(6): 1373-1381.
- 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): 145-152.
- Campbell, M. S. and K. R. Reddy (2004). "Review article: the evolving role of liver biopsy." Aliment Pharmacol Ther **20**(3): 249-259.

- Canbakan, B., H. Senturk, et al. (2010). "Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease?" Biomark Med **4**(2): 205-214.
- Carrion, J. A., M. Navasa, et al. (2006). "Transient elastography for diagnosis of advanced fibrosis and portal hypertension in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation." Liver Transpl **12**(12): 1791-1798.
- Carvalhana, S., J. Leitaó, et al. (2013). "How good is controlled attenuation parameter and fatty liver index for assessing liver steatosis in general population: correlation with ultrasound." Liver Int.
- Caserta, C. A., G. M. Pendino, et al. (2010). "Cardiovascular risk factors, nonalcoholic fatty liver disease, and carotid artery intima-media thickness in an adolescent population in southern Italy." Am J Epidemiol **171**(11): 1195-1202.
- Cassidy, F. H., T. Yokoo, et al. (2009). "Fatty liver disease: MR imaging techniques for the detection and quantification of liver steatosis." Radiographics **29**(1): 231-260.
- Castera, L., X. Forns, et al. (2008). "Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography." J Hepatol **48**(5): 835-847.
- Castera, L., J. Foucher, et al. (2010). "Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations." Hepatology **51**(3): 828-835.
- 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 (FibroScan)." 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): 343-350.
- Catapano, A. L., Z. Reiner, et al. (2011). "ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)." Atherosclerosis **217**(1): 3-46.
- Chen, C. H., C. K. Nien, et al. (2010). "Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification." Dig Dis Sci **55**(6): 1752-1760.
- 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): 518-525.
- Chon, Y. E., K. S. Jung, et al. (2013). "Controlled attenuation parameter (CAP) for detection of hepatic steatosis in patients with chronic liver diseases: a prospective study of a native Korean population." Liver Int.
- Chou, R. and N. Wasson (2013). "Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection." Ann Intern Med **159**(5): 372.
- 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): 646-654.
- Colli, A., P. Pozzoni, et al. (2010). "Decompensated chronic heart failure: increased liver stiffness measured by means of transient elastography." Radiology **257**(3): 872-878.
- Collredo, G., M. Guido, et al. (2003). "Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease." J Hepatol **39**(2): 239-244.

- 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): 1118-1124.
- 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): 1158-1163.
- Currie, C. J., J. R. Peters, et al. (2010). "Survival as a function of HbA(1c) in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study." Lancet **375**(9713): 481-489.
- 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): 1236-1243.
- Day, C. P. (2005). "Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis." Gastroenterology **129**(1): 375-378.
- Day, C. P. and O. F. James (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology **114**(4): 842-845.
- 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): 175-179.
- 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): 592-599.
- 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): 979-988.

- 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): 1043-1048.
- de Ledinghen, V., J. Vergniol, et al. (2012). "Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography." Liver Int **32**(6): 911-918.
- 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): 413-418.
- 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): 833-839.
- DeFilippis, A. P., M. J. Blaha, et al. (2013). "Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis." Atherosclerosis **227**(2): 429-436.
- Despres, J. P., I. Lemieux, et al. (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(6): 1039-1049.
- Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, et al. (2010). "Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease." QJM **103**(2): 71-83.
- 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): 2263-2271.
- Ebrahim, S., F. Taylor, et al. (2011). "Multiple risk factor interventions for primary prevention of coronary heart disease." Cochrane Database Syst Rev(1): CD001561.
- Ekstedt, M., L. E. Franzen, et al. (2006). "Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes." Hepatology **44**(4): 865-873.

- Fabbrini, E., F. Magkos, et al. (2009). "Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(36): 15430-15435.
- Fabbrini, E., S. Sullivan, et al. (2010). "Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications." Hepatology **51**(2): 679-689.
- Fallo, F., A. Dalla Pozza, et al. (2009). "Non-alcoholic fatty liver disease is associated with left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(9): 646-653.
- Ferard, G., F. Imbert-Bismut, et al. (2005). "A reference material for traceability of aspartate aminotransferase (AST) results." Clin Chem Lab Med **43**(5): 549-553.
- Ferard, G., A. Piton, et al. (2006). "Intermethod calibration of alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) results: application to Fibrotest and Actitest scores." Clin Chem Lab Med **44**(4): 400-406.
- Fishbein, M., F. Castro, et al. (2005). "Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound." J Clin Gastroenterol **39**(7): 619-625.
- Fontanges, T., F. Bailly, et al. (2008). "Discordance between biochemical markers of liver activity and fibrosis (Actitest-Fibrotest) and liver biopsy in patients with chronic hepatitis C." Gastroenterol Clin Biol **32**(10): 858-865.
- Fotbolcu, H., T. Yakar, et al. (2010). "Impairment of the left ventricular systolic and diastolic function in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Cardiol J **17**(5): 457-463.
- Foucher, J., L. Castera, et al. (2006). "Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations." Eur J Gastroenterol Hepatol **18**(4): 411-412.
- Foucher, J., E. Chanteloup, et al. (2006). "Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study." Gut **55**(3): 403-408.
- 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): 968-973.

- Fraser, A., R. Harris, et al. (2007). "Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2729-2735.
- Friedman, S. (1999). Schiff's Diseases of the Liver, Lippincott-Raven.
- 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): 2390-2396.
- 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): 1116-1122.
- 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): 492-496.
- Gaia, S., S. Carenzi, et al. (2011). "Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis." J Hepatol **54**(1): 64-71.
- Gara, N., X. Zhao, et al. (2013). "Discordance among transient elastography, aspartate aminotransferase to platelet ratio index, and histologic assessments of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C." Clin Gastroenterol Hepatol **11**(3): 303-308 e301.
- 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): 1537-1544.
- Gaziano, J. M., C. H. Hennekens, et al. (1997). "Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction." Circulation **96**(8): 2520-2525.
- Girshman, J. and S. D. Wolff (2003). "Techniques for quantifying coronary artery calcification." Semin Ultrasound CT MR **24**(1): 33-38.

- Goland, S., S. Shimoni, et al. (2006). "Cardiac abnormalities as a new manifestation of nonalcoholic fatty liver disease: echocardiographic and tissue Doppler imaging assessment." J Clin Gastroenterol **40**(10): 949-955.
- Gomez-Dominguez, E., J. Mendoza, et al. (2008). "Transient elastography to assess hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis." Aliment Pharmacol Ther **27**(5): 441-447.
- Gomez-Dominguez, E., J. Mendoza, et al. (2006). "Transient elastography: a valid alternative to biopsy in patients with chronic liver disease." Aliment Pharmacol Ther **24**(3): 513-518.
- Goossens, N. and F. Negro (2013). "Is the genotype 3 of the hepatitis C virus the new villain?" Hepatology.
- Grattagliano, I., E. Ubaldi, et al. (2013). "Utility of noninvasive methods for the characterization of nonalcoholic liver steatosis in the family practice. The "VARES" Italian multicenter study." Ann Hepatol **12**(1): 70-77.
- Greenland, P., J. S. Alpert, et al. (2010). "2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **56**(25): e50-103.
- Gupte, P., D. Amarapurkar, et al. (2004). "Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus." J Gastroenterol Hepatol **19**(8): 854-858.
- Halfon, P., M. Bourliere, et al. (2006). "Independent prospective multicenter validation of biochemical markers (fibrotest-actitest) for the prediction of liver fibrosis and activity in patients with chronic hepatitis C: the fibropaca study." Am J Gastroenterol **101**(3): 547-555.
- Halfon, P., F. Imbert-Bismut, et al. (2002). "A prospective assessment of the inter-laboratory variability of biochemical markers of fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest) in patients with chronic liver disease." Comp Hepatol **1**(1): 3.

- Halfon, P., M. Munteanu, et al. (2008). "FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis." Gastroenterol Clin Biol 32(6 Suppl 1): 22-39.
- Hallsworth, K., K. G. Hollingsworth, et al. (2013). "Cardiac structure and function are altered in adults with non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol 58(4): 757-762.
- Hamaguchi, M., T. Kojima, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease." World J Gastroenterol 13(10): 1579-1584.
- Harrison, S. A. and B. A. Neuschwander-Tetri (2004). "Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis." Clin Liver Dis 8(4): 861-879, ix.
- 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): 2409-2415.
- Imbert-Bismut, F., D. Messous, et al. (2005). "[Results transferability on RXL, ARX, X-Pand, BN2 (Dade Behring) and modular DP (Roche Diagnostics) analysers: application to component assays of fibrotest and Actitest]." Ann Biol Clin (Paris) 63(3): 305-313.
- Imbert-Bismut, F., D. Messous, et al. (2004). "Intra-laboratory analytical variability of biochemical markers of fibrosis (Fibrotest) and activity (Actitest) and reference ranges in healthy blood donors." Clin Chem Lab Med 42(3): 323-333.
- Imbert-Bismut, F., V. Ratziu, et al. (2001). "Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study." Lancet 357(9262): 1069-1075.
- Ingiliz, P., K. P. Chhay, et al. (2009). "Applicability and variability of liver stiffness measurements according to probe position." World J Gastroenterol 15(27): 3398-3404.
- Ishak, K., A. Baptista, et al. (1995). "Histological grading and staging of chronic hepatitis." J Hepatol 22(6): 696-699.
- Jimba, S., T. Nakagami, et al. (2005). "Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults." Diabet Med 22(9): 1141-1145.

- Jou, J., S. S. Choi, et al. (2008). "Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease." Semin Liver Dis **28**(4): 370-379.
- 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): 885-894.
- Kadayifci, A., V. Tan, et al. (2008). "Clinical and pathologic risk factors for atherosclerosis in cirrhosis: a comparison between NASH-related cirrhosis and cirrhosis due to other aetiologies." J Hepatol **49**(4): 595-599.
- 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): 230-235.
- Kim, D., S. Y. Choi, et al. (2012). "Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcification." Hepatology **56**(2): 605-613.
- Kim, D., W. R. Kim, et al. (2013). "Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States." Hepatology **57**(4): 1357-1365.
- 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): 382-388.
- 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.
- 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): 1313-1321.
- Kotronen, A., L. Juurinen, et al. (2008). "Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes." Gastroenterology **135**(1): 122-130.
- 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): 865-872.

- Kotronen, A., J. Westerbacka, et al. (2007). "Liver fat in the metabolic syndrome." J Clin Endocrinol Metab **92**(9): 3490-3497.
- Kozakova, M., C. Palombo, et al. (2012). "Fatty liver index, gamma-glutamyltransferase, and early carotid plaques." Hepatology **55**(5): 1406-1415.
- Kumar, M., A. Rastogi, et al. (2013). "Controlled attenuation parameter for non-invasive assessment of hepatic steatosis: does etiology affect performance?" J Gastroenterol Hepatol **28**(7): 1194-1201.
- Lafontan, M. and N. Viguerie (2006). "Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin." Curr Opin Pharmacol **6**(6): 580-585.
- 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): 1372-1378.
- Lavie, C. J., R. V. Milani, et al. (2009). "C-reactive protein and cardiovascular diseases--is it ready for primetime?" Am J Med Sci **338**(6): 486-492.
- Lazo, M., R. Hernaez, et al. (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study." BMJ **343**: d6891.
- 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.
- Lee, D. S., J. C. Evans, et al. (2007). "Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 127-133.
- 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): 503-508.
- 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): 479-485.

- Leite, N. C., G. F. Salles, et al. (2009). "Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus." Liver Int **29**(1): 113-119.
- Leite, N. C., C. A. Villela-Nogueira, et al. (2011). "Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors." Liver Int **31**(5): 700-706.
- 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): 1102-1110.
- Leroy, V., P. Halfon, et al. (2008). "Diagnostic accuracy, reproducibility and robustness of fibrosis blood tests in chronic hepatitis C: a meta-analysis with individual data." Clin Biochem **41**(16-17): 1368-1376.
- Lewis, J. R. and S. R. Mohanty (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update." Dig Dis Sci **55**(3): 560-578.
- Liangpunsakul, S. and N. Chalasani (2012). "What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use?" Am J Gastroenterol **107**(7): 976-978.
- Liou, I. W. (2014). "Management of end-stage liver disease." Med Clin North Am **98**(1): 119-152.
- Loguercio, C., T. De Simone, et al. (2004). "Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver." Dig Liver Dis **36**(6): 398-405.
- Lorenz, M. W., H. S. Markus, et al. (2007). "Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis." Circulation **115**(4): 459-467.
- Louagie, H. K., J. T. Brouwer, et al. (1996). "Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C." J Hepatol **25**(1): 10-14.
- Lupsor, M., R. Badea, et al. (2010). "Performance of unidimensional transient elastography in staging non-alcoholic steatohepatitis." J Gastrointestin Liver Dis **19**(1): 53-60.

- 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): 290-295.
- 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): 1562-1568.
- 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): 242-247.
- Marchesini, G., M. Brizi, et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome." Diabetes **50**(8): 1844-1850.
- Masaki, K., S. Takaki, et al. (2013). "Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases." Hepatol Res.
- 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): 1954-1961.
- Mathurin, P., D. Vidaud, et al. (1996). "Quantification of apolipoprotein A-I and B messenger RNA in heavy drinkers according to liver disease." Hepatology **23**(1): 44-51.
- McGill, D. B., J. Rakela, et al. (1990). "A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy." Gastroenterology **99**(5): 1396-1400.
- McKimmie, R. L., K. R. Daniel, et al. (2008). "Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study." Am J Gastroenterol **103**(12): 3029-3035.
- Mederacke, I., K. Wurstorn, et al. (2009). "Food intake increases liver stiffness in patients with chronic or resolved hepatitis C virus infection." Liver Int **29**(10): 1500-1506.

- Miailhes, P., P. Pradat, et al. (2011). "Proficiency of transient elastography compared to liver biopsy for the assessment of fibrosis in HIV/HBV-coinfected patients." J Viral Hepat **18**(1): 61-69.
- Millonig, G., F. M. Reimann, et al. (2008). "Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis." Hepatology **48**(5): 1718-1723.
- Morali, G., Y. Maor, et al. (2007). "Fibrotest-Actitest: the biochemical marker of liver fibrosis--the Israeli experience." Isr Med Assoc J **9**(8): 588-591.
- 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): 635-637.
- Munteanu, M., F. Imbert-Bismut, et al. (2010). "Evaluation of FibroTest inter-laboratory variations requires standardization on analytical systems and should not be mixed with underpowered histological validation." Clin Chim Acta **411**(3-4): 292-293.
- Munteanu, M., D. Messous, et al. (2004). "Intra-individual fasting versus postprandial variation of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest)." Comp Hepatol **3**(1): 3.
- Munteanu, M., V. Ratziu, et al. (2004). "Precautions of use of non-invasive biochemical markers of liver injury FibroTest-ActiTest- FIBROSURE™ (FT-AT) in 32,527 patients with chronic hepatitis C. ." Hepatology **40**: 686A.
- Muraca, M., J. Fevery, et al. (1988). "Analytic aspects and clinical interpretation of serum bilirubins." Semin Liver Dis **8**(2): 137-147.
- Myers, R. P., Y. Benhamou, et al. (2003). "Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients." AIDS **17**(5): 721-725.
- Myers, R. P., M. Elkashab, et al. (2010). "Transient elastography for the noninvasive assessment of liver fibrosis: a multicentre Canadian study." Can J Gastroenterol **24**(11): 661-670.

- Myers, R. P., A. Pollett, et al. (2012). "Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography." Liver Int **32**(6): 902-910.
- 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.
- Myers, R. P., M. H. Tainturier, et al. (2003). "Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with chronic hepatitis B." J Hepatol **39**(2): 222-230.
- Naveau, S., G. Gaude, et al. (2009). "Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease." Hepatology **49**(1): 97-105.
- Naveau, S., T. Poynard, et al. (1994). "Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest." Dig Dis Sci **39**(11): 2426-2432.
- Naveau, S., B. Raynard, et al. (2005). "Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease." Clin Gastroenterol Hepatol **3**(2): 167-174.
- 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): 801-807.
- Ngo, Y., Y. Benhamou, et al. (2008). "An accurate definition of the status of inactive hepatitis B virus carrier by a combination of biomarkers (FibroTest-ActiTest) and viral load." PLoS One **3**(7): e2573.
- Ngo, Y., M. Munteanu, et al. (2006). "A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C." Clin Chem **52**(10): 1887-1896.

- Nobili, V., F. Vizzutti, et al. (2008). "Accuracy and reproducibility of transient elastography for the diagnosis of fibrosis in pediatric nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **48**(2): 442-448.
- O'Leary, D. H., J. F. Polak, et al. (1999). "Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group." N Engl J Med **340**(1): 14-22.
- Obuchowski, N. A. (2006). "An ROC-type measure of diagnostic accuracy when the gold standard is continuous-scale." Stat Med **25**(3): 481-493.
- Ong, J. P., A. Pitts, et al. (2008). "Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease." J Hepatol **49**(4): 608-612.
- 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): 25-29.
- Otsuka, F., S. Sugiyama, et al. (2007). "Hypoadiponectinemia is associated with impaired glucose tolerance and coronary artery disease in non-diabetic men." Circ J **71**(11): 1703-1709.
- Owens, D. and J. Evans (1975). "Population studies on Gilbert's syndrome." J Med Genet **12**(2): 152-156.
- 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): 485-489.
- Pande, R. L., T. S. Perlstein, et al. (2011). "Secondary prevention and mortality in peripheral artery disease: National Health and Nutrition Examination Study, 1999 to 2004." Circulation **124**(1): 17-23.
- Paradis, V., P. Mathurin, et al. (1996). "Binding of apolipoprotein A-I and acetaldehyde-modified apolipoprotein A-I to liver extracellular matrix." Hepatology **23**(5): 1232-1238.

- 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): 105-112.
- Petta, S., V. Di Marco, et al. (2011). "Reliability of liver stiffness measurement in non-alcoholic fatty liver disease: the effects of body mass index." Aliment Pharmacol Ther **33**(12): 1350-1360.
- Piton, A., D. Messous, et al. (2005). "[Alpha 2 macroglobulin immunoturbidimetric assays (DakoCytomation reagents) on Roche Diagnostic analysers (Modular P, Cobas Integra). Application to FibroTest-Actic-Test]." Ann Biol Clin (Paris) **63**(4): 385-395.
- 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): 1213-1219.
- Poynard, T., A. Abella, et al. (1986). "Apolipoprotein AI and alcoholic liver disease." Hepatology **6**(6): 1391-1395.
- Poynard, T., P. Bedossa, et al. (1995). "Apolipoprotein A1 and hepatic fibrosis." J Hepatol **22**(2 Suppl): 107-110.
- Poynard, T., V. de Ledinghen, et al. (2012). "Relative performances of FibroTest, Fibroscan, and biopsy for the assessment of the stage of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a step toward the truth in the absence of a gold standard." J Hepatol **56**(3): 541-548.
- 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): 720-730.
- 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): 1615-1622.

- 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., J. McHutchison, et al. (2003). "Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin." Hepatology **38**(2): 481-492.
- Poynard, T., R. Morra, et al. (2007). "Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease." BMC Gastroenterol **7**: 40.
- 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. Munteanu, et al. (2010). "ActiTest accuracy for the assessment of histological activity grades in patients with chronic hepatitis C, an overview using Obuchowski measure." Gastroenterol Clin Biol **34**(6-7): 388-396.
- Poynard, T., M. Munteanu, 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., Y. Ngo, et al. (2011). "Prognostic value of liver fibrosis biomarkers: a meta-analysis." Gastroenterol Hepatol (N Y) **7**(7): 445-454.
- Poynard, T., V. Ratziu, et al. (2006). "Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic 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.
- Poynard, T., F. Zoulim, et al. (2005). "Longitudinal assessment of histology surrogate markers (FibroTest-ActiTest) during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B infection." Am J Gastroenterol **100**(9): 1970-1980.
- Pradat, P., A. Alberti, et al. (2002). "Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study." Hepatology **36**(4 Pt 1): 973-977.
- Prashanth, M., H. K. Ganesh, et al. (2009). "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus." J Assoc Physicians India **57**: 205-210.
- 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.
- Rafiq, N., C. Bai, et al. (2009). "Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(2): 234-238.
- Ratzu, 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): 207-218.
- Ratzu, 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): 905-911.
- Rigamonti, C., M. F. Donato, et al. (2008). "Transient elastography predicts fibrosis progression in patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation." Gut **57**(6): 821-827.

- Riley, T. R., M. Taheri, et al. (2009). "Does weight history affect fibrosis in the setting of chronic liver disease?" J Gastrointest Liver Dis **18**(3): 299-302.
- Ripoll, C., R. Groszmann, et al. (2007). "Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis." Gastroenterology **133**(2): 481-488.
- 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): 1017-1024.
- Roca, B., E. Resino, et al. (2012). "Interobserver discrepancy in liver fibrosis using transient elastography." J Viral Hepat **19**(10): 711-715.
- Rossi, E., L. Adams, et al. (2003). "Validation of the FibroTest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis C patients." Clin Chem **49**(3): 450-454.
- Ruttmann, E., L. J. Brant, et al. (2005). "Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults." Circulation **112**(14): 2130-2137.
- Saadeh, S., Z. M. Younossi, et al. (2002). "The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease." Gastroenterology **123**(3): 745-750.
- Sagir, A., A. Erhardt, et al. (2008). "Transient elastography is unreliable for detection of cirrhosis in patients with acute liver damage." Hepatology **47**(2): 592-595.
- 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): 280-286.
- Sanyal, A. J., E. M. Brunt, et al. (2011). "Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **54**(1): 344-353.
- 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): 1825-1835.
- Sasso, M., V. Miette, et al. (2012). "The controlled attenuation parameter (CAP): a novel tool for the non-invasive evaluation of steatosis using Fibroscan." Clin Res Hepatol Gastroenterol **36**(1): 13-20.
- Schindhelm, R. K., J. M. Dekker, et al. (2007). "Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study." Atherosclerosis **191**(2): 391-396.
- Schindhelm, R. K., M. Diamant, et al. (2005). "Liver alanine aminotransferase, insulin resistance and endothelial dysfunction in normotriglyceridaemic subjects with type 2 diabetes mellitus." Eur J Clin Invest **35**(6): 369-374.
- Sebastiani, G., A. Vario, et al. (2006). "Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C." J Hepatol **44**(4): 686-693.
- Sene, D., N. Limal, et al. (2006). "Biological markers of liver fibrosis and activity as non-invasive alternatives to liver biopsy in patients with chronic hepatitis C and associated mixed cryoglobulinemia vasculitis." Clin Biochem **39**(7): 715-721.
- Shah, A. G., A. Lydecker, et al. (2009). "Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(10): 1104-1112.
- Shaheen, A. A., A. F. Wan, et al. (2007). "FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis: a systematic review of diagnostic test accuracy." Am J Gastroenterol **102**(11): 2589-2600.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-2180.
- Shoelson, S. E., J. Lee, et al. (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.

- Siddiqui, M. S., R. K. Sterling, et al. (2013). "Association between high-normal levels of alanine aminotransferase and risk factors for atherogenesis." Gastroenterology **145**(6): 1271-1279 e1271-1273.
- 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 e1572.
- 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.
- Sookoian, S. and C. J. Pirola (2008). "Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with carotid atherosclerosis: a systematic review." J Hepatol **49**(4): 600-607.
- Speliotes, E. K., J. M. Massaro, et al. (2010). "Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study." Hepatology **51**(6): 1979-1987.
- Stefan, N., K. Kantartzis, et al. (2008). "Causes and metabolic consequences of Fatty liver." Endocr Rev **29**(7): 939-960.
- Stepanova, M., N. Rafiq, et al. (2013). "Predictors of All-Cause Mortality and Liver-Related Mortality in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." Dig Dis Sci.
- Stepanova, M. and Z. M. Younossi (2012). "Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population." Clin Gastroenterol Hepatol **10**(6): 646-650.
- 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): E462-468.

- Targher, G., L. Bertolini, et al. (2006). "Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease." Diabetes Care **29**(6): 1325-1330.
- Targher, G., L. Bertolini, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients." Diabetes Care **30**(8): 2119-2121.
- 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): 679-683.
- Targher, G., A. Mantovani, et al. (2013). "Non-alcoholic fatty liver disease is associated with an increased prevalence of atrial fibrillation in hospitalized patients with type 2 diabetes." Clin Sci (Lond) **125**(6): 301-309.
- Targher, G., F. Marra, et al. (2008). "Increased risk of cardiovascular disease in non-alcoholic fatty liver disease: causal effect or epiphenomenon?" Diabetologia **51**(11): 1947-1953.
- Targher, G., F. Valbusa, et al. (2013). "Non-alcoholic fatty liver disease is associated with an increased incidence of atrial fibrillation in patients with type 2 diabetes." PLoS One **8**(2): e57183.
- Taylor, A. J., C. N. Merz, et al. (2003). "34th Bethesda Conference: Executive summary--can atherosclerosis imaging techniques improve the detection of patients at risk for ischemic heart disease?" J Am Coll Cardiol **41**(11): 1860-1862.
- Taylor, R. (2008). "Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause." Diabetologia **51**(10): 1781-1789.
- 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): 1029-1034.

- Thabut, D., S. Naveau, et al. (2006). "The diagnostic value of biomarkers (AshTest) for the prediction of alcoholic steato-hepatitis in patients with chronic alcoholic liver disease." J Hepatol **44**(6): 1175-1185.
- Tiggelman, A. M., C. Linthorst, et al. (1997). "Transforming growth factor-beta-induced collagen synthesis by human liver myofibroblasts is inhibited by alpha2-macroglobulin." J Hepatol **26**(6): 1220-1228.
- Toledo, F. G., A. D. Sniderman, et al. (2006). "Influence of hepatic steatosis (fatty liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes." Diabetes Care **29**(8): 1845-1850.
- Treepasertsuk, S., S. Leverage, et al. (2012). "The Framingham risk score and heart disease in nonalcoholic fatty liver disease." Liver Int **32**(6): 945-950.
- Trifan, A., C. Sfarti, et al. (2011). "Increased liver stiffness in extrahepatic cholestasis caused by choledocholithiasis." Hepat Mon **11**(5): 372-375.
- van der Poorten, D., K. L. Milner, et al. (2008). "Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease." Hepatology **48**(2): 449-457.
- Varaut, A., H. Fontaine, et al. (2005). "Diagnostic accuracy of the fibrotest in hemodialysis and renal transplant patients with chronic hepatitis C virus." Transplantation **80**(11): 1550-1555.
- 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): 969-974.
- 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): 1970-1979, 1979 e1971-1973.
- 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): 274-285.

- Videla, L. A., G. Tapia, et al. (2009). "Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients." Obesity (Silver Spring) **17**(5): 973-979.
- Villanova, N., S. Moscatiello, et al. (2005). "Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **42**(2): 473-480.
- 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): 187-193.
- Vizzutti, F., U. Arena, et al. (2007). "Liver stiffness measurement predicts severe portal hypertension in patients with HCV-related cirrhosis." Hepatology **45**(5): 1290-1297.
- Volzke, H., D. M. Robinson, et al. (2005). "Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis." World J Gastroenterol **11**(12): 1848-1853.
- Vuppalanchi, R., R. J. Gould, et al. (2011). "Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network." Hepatol Int.
- Wai, C. T., J. K. Greenson, et al. (2003). "A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C." Hepatology **38**(2): 518-526.
- 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): 372-379.
- Wexler, L., B. Brundage, et al. (1996). "Coronary artery calcification: pathophysiology, epidemiology, imaging methods, and clinical implications. A statement for health professionals from the American Heart Association. Writing Group." Circulation **94**(5): 1175-1192.
- 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): 1139-1144.

- Wilson, L. E., M. Torbenson, et al. (2006). "Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C." Hepatology **43**(4): 788-795.
- Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, et al. (1998). "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." Circulation **97**(18): 1837-1847.
- Wong, G. L., V. W. Wong, et al. (2008). "Assessment of fibrosis by transient elastography compared with liver biopsy and morphometry in chronic liver diseases." Clin Gastroenterol Hepatol **6**(9): 1027-1035.
- 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): 1862-1871.
- 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): 454-462.
- 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): 1721-1727.
- 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): 240-247.
- 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.
- 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): 1288-1295.
- Yoneda, M., H. Mawatari, et al. (2008). "Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)." Dig Liver Dis **40**(5): 371-378.
- Younossi, Z. M., T. Gramlich, et al. (2004). "Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes." Clin Gastroenterol Hepatol **2**(3): 262-265.

- Yun, K. E., C. Y. Shin, et al. (2009). "Elevated alanine aminotransferase levels predict mortality from cardiovascular disease and diabetes in Koreans." Atherosclerosis **205**(2): 533-537.
- Zhao, X. Q., R. A. Krasuski, et al. (2009). "Effects of combination lipid therapy on coronary stenosis progression and clinical cardiovascular events in coronary disease patients with metabolic syndrome: a combined analysis of the Familial Atherosclerosis Treatment Study (FATS), the HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS), and the Armed Forces Regression Study (AFREGS)." Am J Cardiol **104**(11): 1457-1464.
- Zhu, L., S. S. Baker, et al. (2013). "Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH." Hepatology **57**(2): 601-609.
- 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.