

Université de Montréal

CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT INFLAMMATOIRE  
DE L'HÉPATITE CHRONIQUE DU CHIEN

par

JULIE BOISCLAIR

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option pathologie

Avril 2004

©Julie Boisclair, 2004



SF

607

U54

2004

v. 020

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

CARACTÉRISATION DE L'INFILTRAT INFLAMMATOIRE  
DE L'HÉPATITE CHRONIQUE DU CHIEN

présenté par

JULIE BOISCLAIR

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....

Pierre Hélie, président-rapporteur

.....

Christiane Girard, directrice de recherche

.....

Marilyn Dunn, membre du jury

## RÉSUMÉ

L'hépatite chronique canine est une maladie inflammatoire progressive dont l'étiopathogénie est obscure. Afin de caractériser l'infiltrat inflammatoire, 16 cas d'hépatite chronique canine ont été sélectionnés et divisés en trois groupes en fonction de leur stade de fibrose déterminé par la coloration trichrome de Masson. L'infiltrat inflammatoire de chaque section de foie a été évalué à l'aide d'anticorps dirigés contre le CD3, les chaînes légères d'immunoglobulines  $\lambda$  et  $\kappa$  et l' $\alpha$ -actine des muscles lisses.

Plusieurs races étaient affectées et les femelles d'âge moyen prédominaient dans les cas sélectionnés. L'activité nécro-inflammatoire augmentait progressivement pour ensuite diminuer à mesure que l'hépatite progressait vers la cirrhose. Les lymphocytes T étaient les cellules lymphoïdes les plus nombreuses lors d'hépatite chronique canine. Des hépatocytes nécrotiques étaient parfois entourés de lymphocytes T. Une corrélation positive était présente entre la nécrose et le nombre de lymphocytes T. Une corrélation positive entre les cellules positives pour les chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$  et celles positives pour l' $\alpha$ -actine des muscles lisses des espaces portes a été observée. Le nombre de cellules positives à l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (myofibroblastes) dans les espaces portes et les septas fibreux était positivement corrélé avec le stade de fibrose. Au contraire, aucune corrélation n'était présente entre le nombre de cellules de Kupffer (cellules positives au lysozyme) et le stade de fibrose. Ces résultats

supportent l'hypothèse d'un processus à médiation immunitaire lors d'hépatite chronique canine et suggèrent que les myofibroblastes périductulaires jouent un rôle prépondérant lors de fibrogenèse hépatique canine.

**Mots clés :** Hépatite chronique, chien, immunohistochimie, myofibroblastes, lymphocytes CD3+

## Abstract

Canine chronic hepatitis (CCH) is a progressive inflammatory disease of obscure etiopathogenesis. In order to characterize the inflammatory infiltrate, 16 cases of CCH were selected and classified into 3 groups based on the stage of fibrosis as evaluated with Masson's trichrome stain. The inflammatory infiltrate of each liver section was evaluated using CD3, lysozyme,  $\lambda$  and  $\kappa$  immunoglobulin light chains and  $\alpha$ -smooth muscle actin antibodies. Numerous breeds were affected and middle-aged females predominated in selected cases. Necroinflammatory activity progressively increased and then waned as the hepatitis progressed to cirrhosis. T lymphocytes were the most numerous lymphoid cells in CCH. Necrotic hepatocytes were occasionally surrounded by T lymphocytes. Necrosis was positively correlated with the number of T lymphocytes. The B lymphocytes infiltrate was variable but generally mild. A positive correlation between the  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain + cells and the portal  $\alpha$ -smooth muscle actin was found. The number of  $\alpha$ -smooth muscle actin + cells (myofibroblasts) in portal spaces and fibrous septa was positively correlated with the stage of fibrosis. In contrast, there was no correlation between the number of lysozyme + cells (Kupffer cells) and the stage of fibrosis. These results further support the idea of an immune-mediated process in canine chronic hepatitis and suggest that periductular myofibroblasts play an important role in canine liver fibrogenesis.

**Key words :** Chronic hepatitis, dogs, immunohistochemistry, myofibroblasts, CD3 + lymphocytes.



## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract .....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Introduction .....	1
Recension de littérature.....	3
1. Hépatite : définition et classification.....	3
1.1 Définition et causes des hépatites.....	3
1.2 Classification histopathologique des hépatites.....	4
2. Pathogénie des hépatites chroniques .....	5
2.1 Nécrose et apoptose.....	5
2.2 Inflammation .....	6
2.2.1 Cellules de Kupffer .....	6
2.2.2 Lymphocytes.....	8
2.2.3 Neutrophiles .....	9
2.3 La fibrogenèse hépatique : rôle des cellules d'Ito.....	10
2.3.1 Cellules impliquées dans la fibrogenèse du foie.....	11
2.3.2 Régulation de la synthèse collagénique dans le foie.....	12

3. Les hépatites chroniques chez le chien.....	14
Objectifs .....	16
Méthodologie .....	17
Résultats .....	22
Discussion .....	55
Conclusion .....	59
Bibliographie.....	60

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Table 1 : Breed, sex and age of dogs with chronic hepatitis and controls .....	49
Table 2 : Median values for various histological and immunohistochemical variables in groups of dogs at different stages of chronic hepatitis development .....	50

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Liver; control dog. ....	51
Figure 2 : Liver; stage 1 fibrosis .....	51
Figure 3 : Liver; stage 2 fibrosis .....	51
Figure 4 : Liver; stage 3 fibrosis .....	51
Figure 5 : Liver; stage 2 fibrosis. Apoptotic hepatocyte surrounded by CD3 + lymphocytes .....	52
Figure 6 : Liver; control dog. Intralobular $\alpha$ -smooth muscle actin positivity.....	53
Figure 7 : Liver; stage 1 fibrosis. Absence of sinusoidal $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells .....	53
Figure 8 : Liver; stage 2 fibrosis. Presence of some sinusoidal $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells .....	53
Figure 9 : Liver; stage 3 fibrosis. Presence of numerous $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells .....	53-54

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

IL : Interleukine

INF : Interféron

NK cell: Natural killer cell, cellule tueuse naturelle

PDGF: Platelet-derived growth factor, facteur de croissance dérivé des plaquettes

TGF: Transforming growth factor, facteur de croissance nécosant

TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase, Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase

TNF: Tumor necrosis factor, facteur onco-nécrosant

PAF: Platelet activating factor, facteur d'activation plaquettaire

## INTRODUCTION

L'hépatite chronique canine désigne un ensemble de conditions dont l'étiopathogénie demeure souvent obscure. Malgré l'arsenal diagnostique dont nous disposons, la plupart des cas d'hépatite chronique chez le chien demeurent idiopathiques.<sup>11</sup> Plusieurs causes infectieuses et non infectieuses ont été identifiées telles que l'adénovirus canin type 1, *Leptospira interrogans* var. *grippotyphosa*, le virus de l'hépatite canine à cellules acidophiles (canine acidophil cell hepatitis virus), l'accumulation de cuivre, certains médicaments, une anomalie de l' $\alpha$ -1-antitrypsine et l'autoimmunité.<sup>4, 9, 13, 14, 25, 28, 29, 30, 33</sup> Malgré des étiologies variées, la pathogénie semble, à peu de chose près, être la même et conduit à des lésions histologiques semblables telles que la nécrose parcellaire (nécrose périlobulaire), l'inflammation et la fibrose progressive évoluant vers la cirrhose. Au cours des années, les cas d'hépatite chronique canine ont été classifiés histomorphologiquement comme hépatite chronique active, hépatite progressive chronique et hépatite lobulaire disséquante.<sup>3, 11, 12, 31</sup>

Quatre décennies d'investigations histologiques et immunopathologiques ont conduit à des progrès remarquables dans la compréhension des maladies hépatiques chroniques humaines. La caractérisation de l'infiltrat inflammatoire et sa relation avec l'évolution des hépatites humaines a considérablement aidé à la compréhension de la

pathogénie des maladies hépatiques. L'importance de l'histologie et de l'immunopathologie pour l'établissement d'un pronostic est reconnue lors de maladies hépatiques chroniques humaines.<sup>1, 10, 21</sup>

Les hépatites chroniques canines ont amplement été décrites sur le plan histologique mais peu d'informations sont disponibles quant à la nature de la réaction inflammatoire. Le but de notre étude était donc de définir la nature des cellules lymphoïdes impliquées lors d'hépatites chroniques canines, et de tenter de vérifier s'il y a une corrélation entre le stade de fibrose et la présence de cellules lymphoïdes, de cellules de Kupffer, de neutrophiles et de myofibroblastes.

## RECENSION DE LITTÉRATURE

### 1. HÉPATITE : DÉFINITION ET CLASSIFICATION

#### 1.1 Définition et causes des hépatites

Une hépatite se définit comme une réaction inflammatoire ou nécro-inflammatoire au sein du parenchyme hépatique. Dépendamment de la localisation de l'activité inflammatoire/nécro-inflammatoire, l'hépatite peut-être classifiée comme étant portale, périportale, lobulaire ou interstitielle.<sup>8, 18, 19, 23</sup>

Le foie est vulnérable à une grande variété d'agresseurs tels que des toxines ou des xénobiotiques (agissant directement ou via une biotransformation, ou encore induisant de l'hypersensibilité ou des mécanismes auto-immuns), des agents viraux, bactériens ou parasitaires hépatotropiques, des erreurs métaboliques innées ou l'accumulation pathologique de métaux (cuivre ou fer), d'endotoxines ou d'acides biliaires membranolytiques.<sup>8</sup> D'un point de vue morphologique, le foie est un organe relativement simple, dont la réponse, peu importe la nature de l'agression, conduit à des changements histologiques semblables, telle que la dégénérescence hépatocellulaire accompagnée d'accumulations intracellulaires, de nécrose et/ou d'apoptose, d'inflammation, de régénération et finalement, de fibrose.<sup>23</sup>



## 1.2 Classification histopathologique des hépatites

Selon la nature des cellules inflammatoires impliquées, la présence ou non de nécrose et/ou de fibrose, les hépatites se caractérisent également comme étant aiguës ou chroniques. L'hépatite aiguë est caractérisée par de la nécrose hépatocellulaire et des infiltrations de cellules inflammatoires, surtout des neutrophiles, accompagnés ultérieurement de quelques lymphocytes, plasmocytes et macrophages. L'hépatite chronique découle d'une inflammation continue causée par la persistance d'un stimulus antigénique et qui se manifeste par une inflammation mononucléaire constituée de lymphocytes, de macrophages, de plasmocytes et de rares neutrophiles. De la fibrose et des nodules de régénération accompagnent souvent l'hépatite chronique qui peut évoluer vers la cirrhose.<sup>8, 18, 19, 23</sup> En médecine humaine, une évaluation semi-quantitative des critères histologiques susmentionnés ainsi que l'étiologie, lorsque connue, sont utilisées pour établir le pronostic des cas d'hépatite chronique.<sup>1, 2, 10, 21</sup>

## **2. PATHOGÉNIE DES HÉPATITES CHRONIQUES**

Au cours de la dernière décennie, la compréhension des mécanismes pathophysiologiques impliqués lors de maladies hépatobiliaires chroniques a amplement progressé et ce, grâce à l'élaboration de modèles expérimentaux murins ainsi qu'à l'étude d'hépatites spontanées, chez l'humain et certaines espèces animales. Ces recherches ont tenté d'élucider les mécanismes d'un point de vue moléculaire, afin de mieux comprendre le processus pathologique aboutissant à la nécrose hépatocellulaire, l'inflammation, la régénération et la fibrose hépatiques. L'interrelation qui existe entre ces divers phénomènes pathologiques témoigne de la complexité des mécanismes pathophysiologiques sous-jacents aux hépatites chroniques.

### **2.1 Nécrose et apoptose**

La mort hépatocellulaire peut se manifester de deux façons qui se distinguent morphologiquement: la nécrose et l'apoptose. La nécrose implique un gonflement du cytoplasme avec perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique alors que l'apoptose est un processus actif (mort cellulaire programmée) durant lequel il y a une condensation du cytoplasme sans perte d'intégrité membranaire.<sup>8, 23</sup>. Par contre, de récentes études tendent à prouver qu'il existe un chevauchement entre ces deux phénomènes.

Certains stimuli peuvent induire l'une ou l'autre de ces morts cellulaires dépendamment du type cellulaire, du taux d'exposition et de l'état métabolique de la cellule au moment de l'agression. Par exemple, l'exposition modérée à certaines toxines peut induire l'apoptose hépatocellulaire alors qu'une exposition plus grande conduit invariablement à la nécrose<sup>23</sup>. De nombreux facteurs peuvent initier la mort cellulaire lors d'hépatite incluant l'hypoxie, les métabolites réactifs de l'oxygène, l'oxyde nitrique, les acides biliaires (lors de cholestase), certaines toxines, le TNF $\alpha$  et les processus immunitaires impliquant le Fas ligand et les perforines<sup>23</sup>.

## **2.2 Inflammation**

Lors d'hépatite chronique, plusieurs types de cellules résidentes du foie ainsi que des cellules inflammatoires peuvent être impliquées, tout particulièrement les cellules de Kupffer, les lymphocytes/plasmocytes et les neutrophiles.

### **2.2.1 Cellules de Kupffer**

Les cellules de Kupffer constituent 80-90% des macrophages et forment la première ligne de défense du foie.<sup>22</sup> Elles sont responsables de l'initiation des réponses immunologiques hépatiques et de l'induction de la tolérance aux antigènes provenant du système gastro-intestinal.<sup>22, 23</sup> Elles

possèdent une énorme capacité endocytaire pour un large éventail de substances endogènes et exogènes et ont la capacité d'agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes pour l'induction d'une immunité à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes T.<sup>22, 23</sup> Le processus de phagocytose, hautement dépendant en énergie, génère des radicaux libres (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radicaux hydroxylés) et des enzymes protéolytiques importants dans la dégradation intracellulaire d'antigènes mais qui peuvent également endommager les hépatocytes adjacents par peroxydation de leur membrane cytoplasmique ou par protéolyse, respectivement.<sup>22, 23</sup> Suite à la phagocytose, plusieurs métabolites de l'acide arachidonique sont produits par les cellules de Kupffer (prostaglandines D ainsi qu'à un moindre degré prostaglandines E, prostaglandines F, prostacyclines, leukotriène B4 et thromboxanes) .<sup>22, 23</sup> L'effet de ces métabolites est complexe, étant tantôt cytoprotecteur ou tantôt cytotoxique pour les hépatocytes voisins <sup>23</sup>. L'activation des cellules de Kupffer (par des endotoxines par exemple) induit la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ou immunorégulatrices, incluant l'IL-1, l'IL-6, l'INF $\gamma$ , le PAF et le TNF $\alpha$  ainsi que l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B.<sup>22, 23</sup> En plus d'être pro-inflammatoires, l'IL-1, l'IL-6 et le TNF $\alpha$  s'avèrent être fortement hépatotoxiques alors que les éicosanoïdes, autres cytokines et le NF $\kappa$ B agissent comme d'importants médiateurs inflammatoires lors d'hépatite. En plus de causer des dommages hépatocellulaires directs,

les radicaux libres, le  $TNF\alpha$  et le  $TGF\beta$  produits par les cellules de Kupffer activées agissent comme médiateurs de la fibrogenèse faisant suite à de la nécrose et/ou à de l'inflammation hépatique.<sup>8, 22, 23, 27</sup>

### 2.2.2 Lymphocytes

La population résidente de lymphocytes hépatiques (liver associated lymphocytes ou pit cells) est maintenant reconnue comme une population hétérogène. Les études d'immunophénotypage ont démontré que la population de lymphocytes dans le foie était à la fois importante et hétérogène et constitue probablement un système lymphoïde ayant un rôle spécifique lié à sa localisation, là où il est facilement en contact avec des antigènes en provenance du système gastro-intestinal. Ces lymphocytes sont surtout concentrés autour des espaces portes mais peuvent être retrouvés n'importe où dans le parenchyme hépatique. Ils sont en contact étroit avec les cellules de Kupffer et l'endothélium sinusoidal. En circulation, 85% des lymphocytes B et T possèdent des récepteurs spécifiques d'antigènes clonotypiques alors que, dans le foie, 65% des lymphocytes ne possèdent pas de marqueurs spécifiques d'antigènes, sont morphologiquement similaires entre eux et correspondent à des cellules NK. Ces cellules, sur-représentées dans le foie, jouent un rôle clé dans les réponses immunitaires non adaptatives (telle que la surveillance immunitaire contre les tumeurs malignes) et sont contrôlées par certaines cytokines (INF

et interleukines). Même si plus de la moitié de la population des cellules NK hépatiques sont phénotypiquement identiques aux cellules NK en circulation, il y a également une proportion non négligeable de lymphocytes T qui expriment aussi les marqueurs NK (cellules NT). Certains clones de ces cellules NT (particulièrement ceux exprimant les récepteurs  $\gamma\delta$ ) sont particulièrement importants lors de réponses innées aux pathogènes. Les lymphocytes B et T dits "conventionnels", également représentés au sein de la population lymphocytaire hépatique, utilisent des récepteurs clonotypiques afin d'identifier et de réagir à des antigènes présentés dans le contexte des classes d'histocompatibilité majeure par les cellules de Kupffer. Le ratio hépatique de lymphocytes CD4+/CD8+ est de 1 :3 alors qu'il est de 1 :2 en circulation chez l'humain.<sup>23</sup>

### **2.2.3 Neutrophiles**

Les neutrophiles représentent la cellule clé des premiers événements d'une réaction inflammatoire. Ces cellules inflammatoires sont particulièrement importantes pour la défense contre les infections bactériennes et fongiques. Lors de certaines maladies non-infectieuses, par exemple lors d'hépatite d'origine immunitaire, les neutrophiles peuvent parfois entretenir l'inflammation. Tout comme les cellules de Kupffer, les neutrophiles peuvent endommager les tissus environnants au cours du processus inflammatoire. Lors de l'activation des neutrophiles, quelques

granules spécifiques peuvent fusionner avec la membrane cytoplasmique entraînant le relâchement de leur contenu dans le milieu extracellulaire. La présence de ces granules spécifiques dans le micro-environnement extracellulaire peut induire de considérables dommages tissulaires et entretenir l'inflammation même en l'absence d'infection bactérienne ou fongique. Comme les autres cellules inflammatoires, les neutrophiles quittent le flux sanguin en réponse à des cytokines ou chémokines pro-inflammatoires (IL-1 et  $TNF\alpha$ , par exemple) et/ou à un dommage tissulaire. Les neutrophiles arrivent en quelques heures au site du dommage tissulaire afin d'ingérer (phagocytose) les débris cellulaires ou autre matériel étranger (bactéries, fungi, pigments, etc.).<sup>18</sup>

### **2.3 La fibrogenèse hépatique : rôle des cellules d'Ito**

La fibrose hépatique reflète un déséquilibre entre la production et la dégradation de la matrice extracellulaire. Dans un foie normal, la matrice extracellulaire périsinusoïdale a une composition très semblable à celle d'une membrane basale : collagène non fibrillaire tels que les collagènes types IV et VI en plus d'une petite quantité de collagène types I et III. Lors d'hépatite chronique et de cirrhose, de la fibronectine et de la laminine, du collagène type III ainsi qu'une moindre quantité de collagène type I, de même que des protéoglycans, de la tenascine, de la decorine et des biglycans sont déposés dans l'espace de Disse.<sup>23</sup>

### 2.3.1 Cellules impliquées dans la fibrogenèse du foie

Il est maintenant reconnu que les cellules d'Ito, les cellules transitionnelles, les myofibroblastes et les fibroblastes font partie de la même lignée cellulaire et représentent les principales cellules productrices de collagène dans le foie.<sup>23</sup>

Les cellules d'Ito ou cellules hépatiques étoilées (hepatic stellate cells) sont localisées dans l'espace périsinusoïdal, ou espace de Disse, et sont caractérisées par la présence de nombreuses vacuoles lipidiques intracytoplasmiques contenant de la vitamine A.<sup>22, 23</sup> Les processus cytoplasmiques de ces cellules s'étendent entre les hépatocytes.<sup>22, 23</sup> Dans le foie humain, le ratio cellules d'Ito : hépatocytes est de 1 :20. En culture, les cellules d'Ito se divisent et produisent du collagène type I, du collagène type III et de la laminine.<sup>23</sup>

Lorsqu'activées, les cellules d'Ito prolifèrent et subissent une transformation morphologique qui tend vers une différenciation fibroblastique. Ces cellules, dites transitionnelles, perdent leurs vacuoles et sont étroitement associées aux fibres de collagène dans l'espace de Disse. Il existe une corrélation positive entre le nombre de cellules transitionnelles, l'aire de leur réticulum endoplasmique rugueux et la quantité de collagène dans l'espace de Disse.<sup>23</sup>



Les myofibroblastes hépatiques sont identifiés en immunohistochimie par la présence d' $\alpha$ -actine de muscles lisses dans leur cytoplasme et représentent probablement des cellules d'Ito activées. Ils contribuent, grâce à leur propriété contractile, à la contraction cicatricielle observée lors de cirrhose hépatique.<sup>5, 16, 20, 23, 24, 35</sup> Les myofibroblastes dans les foies humain et murin ne sont pas uniquement confinés aux espaces périsinusoïdaux mais peuvent également être retrouvés autour des vaisseaux sanguins hépatiques et des canaux biliaires.<sup>20, 24, 37</sup> Ces myofibroblastes périductulaires semblent également importants lors de fibrogénèse hépatique.<sup>20, 37</sup>

Lors de fibrose hépatique, le nombre de fibroblastes augmente en région périveinulaire ainsi que dans les espaces de Disse. Les fibroblastes produisent particulièrement du collagène type I et à une moindre degré du collagène type III, en plus de collagénases, de fibronectine et de protéoglycans<sup>23</sup>.

### **2.3.2 Régulation de la synthèse collagénique dans le foie**

La pathogénie de la fibrose hépatique implique une cascade complexe d'événements dans lesquels des mécanismes inflammatoires et immunitaires jouent un rôle majeur. *In vivo*, il semble qu'une interaction complexe entre les cytokines et la matrice extracellulaire du foie module la synthèse de collagène. Des cytokines paracrines sécrétées par les cellules de Kupffer, tout particulièrement le TGF $\beta$ , des cytokines autocrines, un stress oxydatif

(péroxydation des lipides) et le NF $\kappa$ B semblent jouer un rôle prépondérant dans l'initiation de l'activation des cellules d'Ito lors de fibrose hépatique. La perpétuation de l'activation des cellules d'Ito cause la déposition de matrice extracellulaire, particulièrement de collagène type I, mais également de laminine et de collagène type IV dans l'espace de Disse.<sup>5, 15, 23</sup> Les facteurs impliqués dans le maintien de l'activation des cellules d'Ito incluent l'augmentation de la sécrétion autocrine de PDGF, la sur-expression des récepteurs du PDGF, la prolifération des cellules d'Ito, la perte de vitamine A, différents mitogènes, et autres cytokines (par exemple l'endothéline-1), produites par les cellules d'Ito.<sup>23</sup>

Le TGF $\beta$  est le médiateur clé de la production de matrice extracellulaire par les cellules d'Ito activées mais d'autres signaux, incluant la perte de rétinoïde (vitamine A), l'IL-1 et le TNF, peuvent y contribuer.<sup>23</sup> La matrice extracellulaire (tout particulièrement les protéoglycans) est un important réservoir de facteurs de croissance et de cytokines diffusibles comme le facteur de croissance des hépatocytes (hepatocyte growth factor ou HGF), le facteur vasculaire de croissance endothéliale (vascular endothelial growth factor ou VEGF) et le PDGF qui peuvent également contribuer à l'activation des cellules d'Ito.<sup>23</sup> La déposition excessive de matrice extracellulaire lors de fibrose augmente par le fait même cette importante réserve de cytokines et de facteurs de croissance.<sup>5, 23</sup> De plus, il semble qu'il y ait un mécanisme alternatif d'interaction entre les cellules d'Ito

et la matrice extracellulaire impliquant une sous-famille de récepteurs de type tyrosine kinase nommée récepteurs avec domaine discoïdine qui produisent un signal en réponse au collagène fibrillaire.<sup>23</sup>

Les facteurs responsables de la dégradation de matrice extracellulaire incluent les collagénases et, les métalloprotéinases matricielles (MMP), en plus d'autres enzymes comme la stromelysine, la plasmine et la métalloprotéinase de type membranaire qui activent certaines métalloprotéinases et gélatinases latentes.<sup>23</sup> Les cellules d'Ito peuvent sécréter la plupart des facteurs impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire<sup>23</sup>. Très tôt au moment de l'activation des cellules d'Ito, ces dernières sécrètent des métalloprotéinases capables de dégrader la matrice extracellulaire mais lorsque complètement activées, les cellules d'Ito synthétisent et sécrètent en grande quantité des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases-1 et -2 (tissue inhibitor of metalloproteinases ou TIMP) résultant en une nette diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire et, conséquemment, une accumulation de matrice extracellulaire.<sup>8, 23</sup>

### **3. LES HÉPATITES CHRONIQUES CHEZ LE CHIEN**

L'adénovirus canin type 1, *Leptospira interrogans* var. *grippotyphosa*, le virus de l'hépatite canine à cellules acidophiles (canine acidophil cell hepatitis virus), l'accumulation de cuivre, différents médicaments, une

anomalie de l' $\alpha$ -1-antitrypsine et l'autoimmunité sont des causes infectieuses et non infectieuses identifiées dans certains cas d'hépatite chez le chien.<sup>4, 9, 13, 14, 25, 28, 29, 30, 33</sup> Même si les techniques diagnostiques ont considérablement évolué, dans la plupart des cas l'agent étiologique impliqué demeure indéterminé.

Malgré des étiologies variables, la pathogénie semble, à peu de chose près, être la même et conduit à des lésions histologiques semblables telles que la nécrose parcellaire (nécrose ou apoptose périportale), l'inflammation et la fibrose progressive évoluant vers la cirrhose. Au cours des années, les cas d'hépatite chronique canine ont été classifiés histomorphologiquement comme hépatite chronique active, hépatite progressive chronique et hépatite lobulaire disséquante.<sup>3, 11, 12, 31</sup> Les hépatites chroniques chez le chien ont amplement été décrites sur le plan histologique mais très peu d'informations sont disponibles dans la littérature vétérinaire quant à la nature de la réaction inflammatoire et leur pathogénèse. Les rares auteurs traitant de la pathogénie de l'hépatite chronique du chien le font par extrapolation directe des données humaines et des modèles murins sans toutefois vérifier si elles sont réellement applicables chez le chien.<sup>6</sup>

## **OBJECTIFS**

L'hépatite chronique du chien a été largement décrite du point de vue histologique, mais il y a peu d'information sur la nature exacte de l'infiltrat inflammatoire. Les objectifs principaux de cette étude étaient d'établir la nature exacte des cellules lymphoïdes impliquées dans les hépatites chroniques du chien et de vérifier la présence de corrélations entre le stade de fibrose et la présence de cellules lymphoïdes, de cellules de Kupffer, de neutrophiles et de myofibroblastes dans des cas d'hépatite chronique du chien.

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Sélection des cas

Tous les cas d'hépatite chronique canine diagnostiqués au service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal de janvier 1986 à mai 1998 ont été révisés. Les critères histologiques utilisés pour la sélection de ces cas ont été adaptés de la nomenclature suggérée par l'*International Association of the study of the liver* et par le *World Congress of gastroenterology*, et incluent la nécrose parcellaire, la fibrose portale et périportale, et l'activité nécroinflammatoire portale et périportale.<sup>2</sup> Les critères histologiques de la cirrhose incluent la régénération hépatique nodulaire avec fibrose en pont progressive, associée à de l'inflammation. Seize cas d'hépatite chronique idiopathique ont été sélectionnés selon ces critères et classifiés en trois groupes selon le stade de fibrose (1 = fibrose portale légère; 2 = fibrose portale modérée avec fibrose périportale et septale légère ; 3 = fibrose portale sévère avec fibrose périportale et septale marquée ou cirrhose). Des sections de foie normal obtenues de 5 chiens sans évidence de problèmes infectieux, néoplasiques et/ou cardiaques à la nécropsie ont été utilisées comme contrôles.

## 2. Histopathologie

Tous les échantillons de foie ont été fixés dans la formaline tamponnée 10%, traités selon un protocole standard, puis enrobés dans la paraffine. Des sections de 4  $\mu\text{m}$  ont été coupées et colorées à l'hématoxyline, la phloxine et au safran (HPS) ainsi qu'au trichrome de Masson.

## 3. Procédures immunohistochimiques

En immunohistochimie, l'anticorps CD79 (Hm57) était peu sélectif et colorait les hépatocytes et les muscles lisses en plus des lymphocytes B. De nombreux essais infructueux ont été effectués afin de bloquer cette coloration indésirable. Les anticorps des chaînes d'immunoglobulines légères  $\lambda$  et  $\kappa$  ont donc été utilisés comme marqueurs pour les lymphocytes B.

Chacun des foies a été évalué pour l'expression du CD3, des chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$ , du lysozyme et de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses en utilisant la technique de la peroxydase complexe avidine et biotine (technique ABC, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Des sections de 4  $\mu\text{m}$  ont été montées sur des lames recouvertes de poly-D-lysine puis ont été asséchées à 37°C pendant 18 h. Les sections ont ensuite été déparaffinées dans le xylène, déshydratées dans l'alcool éthylique et réhydratées dans l'eau distillée pendant 5 min. Les sections sujettes à la trypsinisation (CD3, lysozyme, chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$ ) ont été incubées dans le tampon salin tris (tris buffer) contenant 0,1% de trypsine et 0,1% de  $\text{CaCl}_2$  pendant 20 min,

puis ont été rincées 5 min à trois reprises dans le tampon salin phosphaté (PBS). L'activité endogène de la peroxydase a été bloquée dans le peroxyde d'hydrogène 3% dilué dans le méthanol pour 30 min, suivi de trois rinçages de 5 min dans le PBS. Pour réduire le « bruit de fond », les sections ont été incubées dans un sérum normal 20%. Du sérum normal de chèvre a été utilisé pour les anticorps polyclonaux (CD3, lysozyme, chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$ ) et du sérum normal de cheval a été utilisé pour l'anticorps monoclonal ( $\alpha$ -actine des muscles lisses). Les sections ont ensuite été incubées dans l'anticorps primaire approprié (1: 400 CD3, Dako corp., Carpinteria, CA; 1: 100  $\alpha$ -actine des muscles lisses, Dako corp., Carpinteria, CA; 1: 50 lysozyme, Dako corp., Carpinteria, CA; 1: 4000 chaînes légères  $\kappa$ , Novocastra laboratories, Inc., Newcastle, UK; ou 1: 2000 chaînes légères  $\lambda$ , Novocastra laboratories, Inc., Newcastle, UK) pendant 60 min. L'anticorps biotinilé approprié (chèvre anti-lapin ou cheval anti-souris) a été ensuite appliqué pour 45 min. L'ABC a été mélangé, incubé pendant 30 min puis appliqué sur les sections pour 45 min. À l'exception de l'incubation avec le sérum normal, toutes les incubations ont été suivies de 3 rinçages dans le PBS et ont été effectuées à température de la pièce dans une chambre humide. L'aminoéthylcarbazole (AEC) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) a été utilisé comme chromogène; les sections ont été contre-colorées avec l'hématoxyline Mayer (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) puis recouvertes d'une lamelle. Des contrôles positifs et négatifs étaient présents



à chacune des expérimentations. Des nœuds lymphatiques canins normaux ont été utilisés comme contrôles positifs sur chacune des lames, sauf dans le cas de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses pour laquelle une section d'intestin normal de chien était utilisée. Les contrôles négatifs étaient des sections du tissu examiné sur lesquelles on omettait l'étape de l'anticorps primaire.

#### **4. Analyses quantitatives et semi-quantitatives**

Pour chacune des sections, les cellules positives au CD3 et aux chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$  ainsi que les neutrophiles étaient comptés au sein de 12 espaces portes (grossissement 40X) et de 12 régions lobulaires sélectionnés aléatoirement (grossissement 20X). Les septas fibreux étaient considérés comme des extensions des espaces portes. Les cellules étaient toujours comptées par les mêmes deux observateurs en accord. Pour chacun des types cellulaires, la médiane des espaces portes et des régions lobulaires a été déterminée.

L'évaluation semi-quantitative était effectuée par deux observateurs conjointement. L'activité nécro-inflammatoire et la cholestase étaient semi-quantitativement évaluées comme absente (0); légère (1); modérée (2); et sévère (3). L'inflammation était évaluée sans égard aux types cellulaires présents. La prolifération de canaux biliaires était également semi-quantitativement évaluée comme absente (0); légère – moins de 3 canaux biliaires par espace porte (1); modérée – 3 à 5 canaux biliaires par espace

porte (2); et sévère – plus de 5 canaux biliaires par espace porte (3). Des analyses semi-quantitatives ont également été utilisées afin de grader l'expression de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (0 = absence; 1= faible et multifocale; 2 = modérée; et 3 = forte) et du lysozyme (0 = très peu de cellules de Kupffer; 1 = quelques cellules de Kupffer; 2 = nombre modéré de cellules de Kupffer; et 3 = nombreuses cellules de Kupffer). L' $\alpha$ -actine des muscles lisses était évaluée pour les espaces portes incluant les septas fibreux et les régions lobulaires. Afin d'estimer les cellules de Kupffer, le lysozyme a été évalué seulement dans les sinusoides.

## **5. Analyses statistiques**

Afin de comparer les groupes, le Kruskal Wallis H-test a été appliqué. Lorsque la différence était statistiquement significative, le Wilcoxon-Mann-Whitney U-test utilisant un niveau de signification en relation avec les comparaisons était effectué entre chaque paire de groupes. Les résultats ont également été analysés par des tests de corrélations de Spearman afin de vérifier une association possible entre les changements histologiques et les cellules inflammatoires. Un niveau nominal significatif de  $p < 0.05$  a été utilisé.

## **RÉSULTATS**

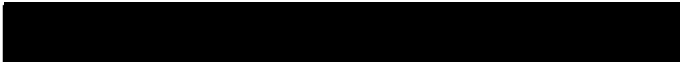
### **ARTICLE**

J. Boisclair, M. Doré, G. Beauchamp, L. Chouinard and C. Girard.  
**Characterization of the Inflammatory Infiltrate in Canine Chronic  
Hepatitis. Veterinary Pathology 38, 628-635, 2001.**

**Characterization of the Inflammatory Infiltrate in Canine  
Chronic Hepatitis**

J. Boisclair, M. Doré, G. Beauchamp, L. Chouinard and C. Girard  
Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine  
Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, PQ, Canada  
(JB, MD, GB, CG); and ClinTrials BioResearch,  
Senneville, PQ, Canada (LC)

Request reprints from Dr. J. Boisclair, Département de Pathologie et  
Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal,  
C.P. 5000, St-Hyacinthe, PQ J2S 7C6 (Canada).



## Abstract

Canine chronic hepatitis (CCH) is a progressive inflammatory disease of unknown etiology. To characterize the inflammatory infiltrate, 16 dogs with CCH were selected and classified into three groups based on the stage of fibrosis, as evaluated with Masson's trichrome stain. The inflammatory infiltrate in each liver section was immunohistochemically characterized and evaluated using CD3, lysozyme,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain, and  $\alpha$ -smooth muscle actin antibodies. Numerous breeds were affected, and middle-aged females predominated in this select group. Necroinflammatory activity progressively increased and then waned as the hepatitis progressed to cirrhosis. CD3+ lymphocytes were the most numerous lymphoid cells in dogs with CCH. Degenerate hepatocytes were occasionally surrounded by CD3+ lymphocytes. Necrosis was positively correlated with the number of CD3+ lymphocytes. The  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cell infiltrate was variable but generally mild. A positive correlation between the  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells and the portal  $\alpha$ -smooth muscle actin was found. The number of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells (myofibroblasts) in portal triads and fibrous septa was positively correlated with the stage of fibrosis. In contrast, no correlation was found between the number of lysozyme-positive cells (Kupffer cells) and the stage of fibrosis. These results further support the idea

of an immune-mediated process in CCH and suggest that periductular myofibroblasts play an important role in canine liver fibrogenesis.

Key words: CD3+; lymphocytes; chronic hepatitis; dogs; immunohistochemistry; myofibroblasts.

## INTRODUCTION

Canine chronic liver disease encompasses various forms of chronic hepatitis and cirrhosis whose etiopathogenesis is still obscure. In spite of the diagnostic arsenal currently available, most of the cases of canine chronic liver disease remain idiopathic.<sup>6</sup> Several infectious and noninfectious causes have been suggested for chronic liver disease, such as canine adenovirus type 1 (CAV-1), *Leptospira interrogans* var. *grippotyphosa*, canine acidophil cell hepatitis virus, copper accumulation, drug administration, alpha-1-antitrypsin anomaly, and autoimmunity.<sup>4,8,12,13,16,20,23,28</sup> Despite variable etiologies, cases of canine chronic hepatitis (CCH) share similar histologic changes, including piecemeal necrosis, inflammation, and progressive fibrosis that evolves into cirrhosis. Over the years, CCH has been classified histomorphologically as chronic active hepatitis, chronic progressive hepatitis, and lobular dissecting hepatitis.<sup>3,10,11,26</sup>

Four decades of histologic and immunopathologic investigations have led to remarkable progress in the understanding of chronic human liver diseases. An understanding of the composition of the inflammatory infiltrate and its relationship to the evolution of human hepatitis has been very helpful for determining the pathogenesis of liver disease. The importance of histology and immunopathology as prognostic values has largely been shown in human cases of liver disease.<sup>1,9,18</sup>

CCH has been widely described histologically, but there is a paucity of information regarding the exact nature of the inflammatory infiltrate. The aims of the present study were to define the nature of the lymphoid cells involved in CCH and to look for correlations between the stage of fibrosis and the presence of lymphoid cells, Kupffer cells, neutrophils, and myofibroblasts in selected dogs with CCH.



## MATERIAL AND METHODS

### Case selection

All biopsy and necropsy cases of CCH and cirrhosis diagnosed at the Service de Diagnostic of the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, from January 1986 to May 1998 were reviewed. The histologic criteria used for selection of the cases were adapted from a definition suggested by the International Association of the Study of the Liver and by the World Congress of Gastroenterology; these criteria included piecemeal necrosis, portal and periportal fibrosis, and portal to periportal necroinflammatory activity.<sup>2</sup> Histologic criteria for cirrhosis included nodular regeneration with progressive bridging fibrosis associated with inflammation. Sixteen dogs with idiopathic chronic hepatitis were selected on the basis of these criteria and on the absence of a specific cause and were classified into three groups based on the stage of fibrosis (1 = mild portal fibrosis; 2 = moderate portal fibrosis with mild periportal and septal fibrosis; 3 = severe portal fibrosis with marked periportal and septal fibrosis or cirrhosis). Normal liver sections obtained from five dogs without evidence of infectious, neoplastic, or cardiac disease were used as controls.

## **Histopathology**

All liver samples were fixed in 10% buffered formalin, routinely processed, and embedded in paraffin. Four-micrometer sections were cut and stained with hematoxylin, phloxin, and saffron (HPS) and with Masson's trichrome for light microscopic examination.

## **Immunohistochemical procedure**

In canine liver, anti-CD79 (Hm57) antibody was very indiscriminant and stained hepatocytes and smooth muscle cells as well as B lymphocytes. Trials to block this background staining were unsuccessful; therefore,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain antibodies were used.

Each liver was evaluated for the expression of CD3,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chains, lysozyme, and  $\alpha$ -smooth muscle actin using an avidin–biotin peroxidase complex (ABC) technique (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Four-micrometer sections were mounted on poly-D-lysine–coated slides and dried at 37 C for 18 hours. Sections were deparaffinized in xylene, dehydrated in ethyl alcohol, and rehydrated in distilled water for 5 minutes. Sections subjected to trypsinization (CD3, lysozyme,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chains) were incubated in tris-buffered saline with 0.1% trypsin and 0.1%  $\text{CaCl}_2$  for 20 minutes and rinsed for 5 minutes three times in cold phosphate-buffered saline (PBS). Endogenous peroxidase activity was blocked in 3% hydrogen peroxide diluted in methanol for 30 minutes followed by three 5-minute PBS

rinses. To reduce background staining, sections were incubated in 20% normal serum for 20 minutes. Normal goat serum was used for polyclonal antibodies (CD3, lysozyme,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chains), and normal horse serum was used for monoclonal antibodies ( $\alpha$ -smooth muscle actin). Sections were then incubated with the appropriate primary antibody (1:400 CD3, Dako Corp., Carpinteria, CA; 1:100  $\alpha$ -smooth muscle actin, Dako Corp.; 1:50 lysozyme, Dako Corp.; 1:4,000  $\kappa$  light chain, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK; or 1:2,000  $\lambda$  light chain, Novocastra Laboratories) for 60 minutes. Appropriate biotinylated antibodies (goat anti-rabbit or horse anti-mouse) were then applied for 45 minutes. The ABC was mixed, incubated for 30 minutes, and applied to the sections for 45 minutes. Except for the incubation with normal serum, all incubations were followed by washes in PBS and were done at room temperature in a moist chamber. Aminoethylcarbazole (AEC) (Vector Laboratories) was used as chromagen, and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and coverslipped. Positive and negative control tissues were included in each experiment. Normal canine lymph nodes were used as positive control for all except the  $\alpha$ -smooth muscle actin slide, for which the positive control was a section of canine intestine. Negative controls were duplicate sections of the examined tissue for which the primary antibody step was omitted.

### **Quantitative and semiquantitative analyses**

CD3+ cells,  $\kappa$  and  $\lambda$  light chain–positive cells, and neutrophils were counted in 12 randomly selected portal areas (40x) and 12 lobular areas (20x) of liver for each slide. Fibrous septa were considered extensions of portal triads. Cells were always counted by the same two observers in agreement (J. Boisclair and C. Girard). The median was determined for portal space and lobular area for each cell type.

Semiquantitative scoring was done by two observers in agreement (L. Chouinard and C. Girard or J. Boisclair and C. Girard). Necroinflammatory activity and cholestasis were semiquantitatively scored as absent (0), mild (1), moderate (2), or severe (3). Inflammation was evaluated regardless of cellular type. Bile duct proliferation was also semiquantitatively scored as absent (0), mild (less than three bile ducts per portal space, 1); moderate (three to five bile ducts per portal space, 2); and severe (more than five bile ducts per portal space, 3). Semiquantitative analysis (J. Boisclair and C. Girard) was also used to grade the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin (0 = absence; 1 = weak and multifocal; 2 = moderate; and 3 = strong) and lysozyme (0 = very few Kupffer cells; 1 = some Kupffer cells; 2 = moderate number of Kupffer cells; and 3 = numerous Kupffer cells). The  $\alpha$ -smooth muscle actin was scored for portal tracts including fibrous septa and lobular areas. To assess Kupffer cells, lysozyme was scored in sinusoids only.

**Statistical analysis**

To compare groups, the Kruskal–Wallis *H*-test was applied. When the differences were significant, the Wilcoxon Mann–Whitney *U*-test using comparison-related significance levels was performed for all pairs of groups. Results were also analyzed by Spearman's correlation test to verify a possible association between histologic changes and numbers of inflammatory cells. A nominal significance level of  $P < 0.05$  was used.

## RESULTS

### Characteristics of selected dogs

Sixteen dogs with CCH or cirrhosis were grouped based on the stage of fibrosis (Figs. 1–4). Characteristics of affected dogs and controls are presented in Table 1. The mean age of affected dogs was 5.5 years (range 1-13 years). Females were overrepresented (10 females, six males). Ages of control dogs ranged from 3 to 5 years ( $\bar{x}$  = 3.8 years), and there were three males and two females.

### Immunohistochemistry

CD3+ lymphocytes were the most numerous lymphoid cells observed in portal triads of affected dogs. Numbers of CD3+ cells varied greatly among portal triads for a given individual and among individuals within a group. In lobular areas, CD3+ lymphocytes were more numerous in proximity of centrilobular veins. Randomly distributed round, intensely eosinophilic hepatocytes surrounded by CD3+ lymphocytes were seen in eight dogs, all with stage 1 or 2 fibrosis (Fig. 5). No CD3+ lymphocytes were seen in hepatic lobular areas and portal triads of control dogs, except a few CD3+ lymphocytes in portal spaces of one animal.

Intralobular  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells were not evaluated because of the difficulty of differentiating intrasinusoidal from intralobular cells. Generally,  $\lambda$  light chain-positive cells were more numerous than  $\kappa$  light chain-positive cells. Numbers of  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells differed greatly among portal triads for a given individual and among individuals within a group, but this infiltrate was generally mild compared with CD3+ lymphocytes. As for CD3, very few  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells were observed in hepatic portal triads of some controls.

Lysozyme antibody stained neutrophils as well as macrophages, monocytes, and Kupffer cells. To assess Kupffer cells, only intrasinusoidal stellate or fusiform lysozyme-positive cells were evaluated. The distribution of intrasinusoidal lysozyme-positive cells in controls was mainly perilobular. There was no particular distribution in affected dogs.

Intralobular  $\alpha$ -smooth muscle actin positivity was mainly linear, fine, and bordering the perisinusoidal space (Fig. 6). Intralobular distribution of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells was diffuse in controls, compared with the irregular distribution observed in fibrotic livers; some lobules contained numerous  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells, whereas only a few positive cells were seen in other lobules. In nonfibrotic areas of affected livers, the number of sinusoidal  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells was similar or reduced compared with controls. Positivity was often reduced or absent in foci of nodular hyperplasia. Few  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells were noted

around blood vessels in the portal space of controls. In livers showing chronic hepatitis, numerous  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells were observed in and around enlarged portal areas and in fibrous septa (Figs. 7–9).

### **Scoring and statistical analysis**

All statistical results are summarized in Table 2.

*Comparison of histologic changes among dogs in different stages of fibrosis.* Inflammation status varied among stages of fibrosis (Table 2). Post hoc tests revealed that inflammation was increased in dogs with stages 2 and 3 compared with controls. Neutrophils were significantly more numerous in dogs with stage 2 fibrosis compared with controls.

Necrosis in dogs with stage 2 fibrosis was significantly increased compared with controls. Dogs in Stage 1 and 3 also tended to have more necrosis than did the control group. However, there was no significant difference in necrosis among dogs in the three stages of fibrosis.

Cholestasis and bile duct proliferation were increased significantly in dogs with stages 2 and 3 fibrosis compared with controls.

*Comparison of immunohistochemical observations among dogs in different stages of fibrosis.* Compared with controls and group 3 dogs, dogs with stage 2 fibrosis had higher numbers of CD3+ cells in triads and fibrous septa. According to the global test (Kruskal–Wallis test), there was a significant difference between groups, but the post hoc test (Wilcoxon



Mann-Whitney *U*-test) did not confirm this difference. Dogs in stage 2 also tended to have more intralobular CD3+ cells, but the difference was not significant. The number of  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells in portal triads was higher in dogs with stage 2 fibrosis than in controls.

There was no difference among stages of fibrosis in regard to sinusoidal lysozyme and  $\alpha$ -smooth muscle actin. However, the density of sinusoidal  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells was higher in controls than in dogs with stage 1 fibrosis. In contrast,  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells in portal triads were significantly more numerous in dogs with stage 3 fibrosis than in controls and dogs in stage 1 and were significantly more numerous in dogs with stage 2 fibrosis than in controls.

*Association between inflammatory cells and histologic changes.*

According to the Spearman correlation test, the number of CD3+ cells in portal triads was positively correlated with the number of neutrophils and  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells ( $P < 0.001$ ). The number of  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells was positively associated with the number of neutrophils ( $P < 0.001$ ). There was also a significant positive association between necrosis scores and the number of portal and lobular CD3+ lymphocytes ( $P < 0.001$ ),  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells ( $P < 0.001$ ), and neutrophils ( $P < 0.001$ ).

The density of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells in portal triads was positively correlated with fibrosis ( $P < 0.005$ ), inflammation ( $P < 0.001$ ),

necrosis ( $P < 0.001$ ), and bile duct proliferation ( $P < 0.05$ ). A positive association was noted between the portal  $\alpha$ -smooth muscle actin scoring and the number of  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain-positive cells ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSSION

Middle-aged purebred dogs were overrepresented in this study. Females predominated in the selected dog population, as has been the case in several previous reports of chronic hepatitis.<sup>8,11,21,26,27</sup>

In the present study, livers were grouped according to the stage of fibrosis. Fibrosis is a well-known prognostic indicator in human chronic hepatitis.<sup>29,31</sup> It has also been recognized as a progression factor in Doberman Pinscher hepatitis.<sup>25</sup>

Cholestasis and bile duct proliferation increased along with stage of fibrosis possibly because of the compression exerted on bile ducts in distorted fibrotic liver and/or a cytokine-induced proliferation of bile ducts.<sup>24</sup>

The necroinflammatory activity tended to increase progressively in dogs with stages 1 and 2 fibrosis and then to subside in dogs with stage 3 fibrosis. This finding might indicate that the process is active in the subacute phase of canine hepatitis but wanes as the hepatitis progresses to a more chronic stage. Furthermore, according to the Spearman correlation test, necrosis was positively associated with the number of inflammatory cells (CD3+ cells,  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain–positive cells and neutrophils).

In the lobules, CD3+ lymphocytes were more numerous in centrilobular areas, as noted in Doberman Pinscher hepatitis.<sup>27</sup> CD3+ lymphocytes closely apposed to degenerated hepatocytes were noted in eight dogs, all in stages

1 or 2 fibrosis and belonging to different breeds. A positive correlation between necrosis and the number of portal and lobular CD3+ lymphocytes was noted. These results further support the hypothesis of an immune-mediated response in some cases of canine chronic liver disease.<sup>26,27</sup> The  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain–positive cell infiltrate was variable but generally mild. The positive correlation between the  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain–positive cells and the portal  $\alpha$ -smooth muscle actin is difficult to explain. In human hepatic fibrogenesis, B cells do not seem to be implicated in the process of activation and transformation of the myofibroblast-like cells.<sup>14</sup>

The nature of the mononuclear infiltrate could not be determined immunohistochemically in dog No. 8; most mononuclear cells were CD3 and  $\lambda$  and  $\kappa$  light chains negative. Inadequate fixation might have deteriorated the epitopes recognized by the CD3 and  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain antibodies. The presence of CD3- and  $\lambda$  and  $\kappa$  light chain–negative cells may also suggest the involvement of natural killer cells in few dogs with CCH, but this hypothesis would have to be confirmed by the use of specific antibodies for those cells.

Alpha smooth muscle actin is a marker for Ito cells and myofibroblasts. Ito cells in humans and rats increase in number and differentiate into myofibroblast-like cells, with marked expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin during hepatic fibrogenesis.<sup>5,15,17,19,30</sup> Myofibroblasts in normal human and rat livers are not confined to perisinusoidal spaces but can also be found around blood vessels and bile ducts.<sup>17,19,32</sup> Those periductular myofibroblasts seem

important in hepatic fibrosis and liver remodeling.<sup>17,32</sup> When activated by various cytokines (e.g., transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor), Ito cells and probably periductular myofibroblasts are qualitatively and quantitatively the most important producers of extracellular matrix proteins in human and rat chronic liver diseases.<sup>5,14</sup> Activated human Ito cells also produce an inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1), decreasing interstitial collagenase activity and contributing to extracellular matrix accumulation.<sup>5</sup> As in human and rat chronic liver disease,  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells, corresponding probably to periductular myofibroblasts, tended to increase in portal and fibrotic areas along with the stage of fibrosis. The expression of sinusoidal  $\alpha$ -smooth muscle actin (Ito cells) increased in lobular areas adjacent to fibrosis, principally around expanded portal spaces and fibrous septa as already noted for human chronic hepatitis.<sup>30</sup> Absence of positive cells in foci of nodular hyperplasia might be due to a lack of migration of Ito cells during hepatic regeneration. According to Spearman correlation tests, the density of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells in portal triads was correlated with inflammation, bile duct proliferation, and fibrosis. These results suggest that inflammation in canine liver, as in human and rat liver, is associated with the activation of periductular myofibroblasts and possibly the proliferation of bile ducts.<sup>5,14,24</sup>

In mouse and human liver disease, Kupffer cells are a source of tumor necrosis factor, and this cytokine is partly responsible for activation of

myofibroblasts and T lymphocytes.<sup>7,22</sup> In the present study, there was no difference in number of intrasinusoidal lysozyme-positive cells among diseased livers and controls. The role of Kupffer cells in canine hepatitis needs further investigation.

Numerous dog breeds were affected with CCH, and middle aged females predominated. Necroinflammatory activity progressively increased and then waned as the hepatitis progressed to cirrhosis. The predominance of CD3+ lymphocytes and the presence of degenerated hepatocytes surrounded by those cells in many cases of active stage of chronic hepatitis was highly suggestive of an immune-mediated process. The exact phenotype of the CD3+ lymphocytes (CD4 or CD8) should be investigated. Periductular myofibroblasts seemed to play an important role in canine liver fibrogenesis.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

We thank J. Deslandes, D. Naydan, J. Cardin, L. Pépin, and B. Pépin for technical assistance. Funding from Le fonds Du Centenaire supported this research.

## REFERENCES

1. Baptista A, Bianchi L, De Groote J, Desmet VJ, Ishak KG, Korb G, MacSween RNM, Popper H, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H: The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathology* **12**: 569-579, 1988
2. Batts KP, Ludwig J: Chronic hepatitis: an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* **19**: 1409-1417, 1995
3. Bennet AM, Davies JD, Gaskell CJ, Lucke VM: Lobular dissecting hepatitis in the dog. *Vet Pathol* **20**: 179-188, 1983
4. Bishop L, Strannberg JD, Adams RJ, Brownstein DG, Patterson R: Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospire. *Am J Vet Res* **40**: 839-844, 1979
5. Burt AD: Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* **170**: 105-115, 1993



6. Chouinard L, Martineau D, Forget C, Girard C: Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis and cirrhosis. *J Vet Diagn Invest* **10**: 320-325, 1998
7. Cotran R, Kumar V, Collins T: *Robbin's Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. pp 845-901, WB Saunders, Philadelphia, PA 1999
8. Crawford MA, Schall WD, Jensen RK, Tasker JB: Chronic active hepatitis in 26 Doberman Pinschers. *J Am Vet Med Assoc* **187**: 1343-1350, 1985
9. Desmet VJ: Histological classification of chronic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* **60**: 259-267, 1997
10. Doige C, Lester S: Chronic active hepatitis in dogs: a review of fourteen cases. *J Am Anim Hosp Assoc* **17**: 725-730, 1981
11. Fuentealba C, Guest S, Haywood S, Homey B: Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. *Can Vet J* **38**: 365-373, 1997
12. Gocke DJ, Morris TQ, Bradley SE: Chronic hepatitis in dogs: the role of immune factor. *J Am Vet Med Assoc* **156**: 1700-1705, 1970

13. Gocke DJ, Preiseg R, Morris TQ, McKay DG, Bradley SE: Experimental viral hepatitis in the dog: the production of persistent disease in partially immune animals. *J Clin Invest* **46**: 1506-1517, 1967
14. Gressner AM: Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol* **30**: 5-16, 1992
15. Hautekeete ML, Geerts A: The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch* **430**: 195-207, 1997
16. Jarret WHF, O'Neil BW: A new transmissible agent causing acute hepatitis, chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. *Vet Rec* **116**: 629-635, 1985
17. Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G: Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: Distinct roles of myofibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* **112**: 387-401, 1999

18. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J: Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* **5**: 431-435, 1981
19. Nouchi T, Takana Y, Tsukada T, Sato C, Marumo F: Appearance of  $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* **11**: 100-105, 1991
20. Poffenbarger EM, Hardy RM: Hepatic cirrhosis associated with long term primidone therapy in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **186**: 978-980, 1985
21. Rutgers HC, Haywood S: Chronic hepatitis in the dog. *J Small Anim Pract* **29**: 679-690, 1988
22. Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G: Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* **157**: 1671-1683, 2000
23. Sevelius E, Anderson M, Jönson L: Hepatic accumulation of alpha-1-antitrypsine in chronic liver disease. *J Comp Pathol* **111**: 401-412, 1994

24. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N: Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* **99**: 466-477, 1990
25. Speeti M, Eriksson J, Saari S, Westermarck E: Lesions of subclinical Doberman hepatitis. *Vet Pathol* **35**: 361-369, 1998
26. Strombeck DR, Gribble DG: Chronic active hepatitis in the dog. *J Am Vet Med Assoc* **173**: 380-386, 1978
27. Thornburg LP: Histomorphological and immunohistochemical studies of chronic active hepatitis in Doberman Pinscher. *Vet Pathol* **35**: 380-385, 1998
28. Thornburg LP, Shaw D, Dolan M, Raisbeck M, Crawford S, Dennis GL, Olwin DB: Hereditary copper toxicosis in West Highland White Terriers. *Vet Pathol* **23**: 148-154, 1986
29. Vaquer P, Canet R, Llompant A, Riera J, Obrador A, Gaya J: Histological evolution of chronic hepatitis C: factors related to progression. *Liver* **14**: 265-269, 1994

30. Yamaoka K, Nouchi T, Marumo P, Sato C: Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers. *Dig Dis Sc* **38**: 1473-1479, 1993
31. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkawitch JH, Ludwig J, Okuda K: The long term evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23**: 1334-1340, 1996
32. Zimmermann A, Zimmermann H, Fellay M, Reichen J: Cells with morphological and immunohistochemical features of hepatic stellate cells (Ito cells) form an extralittoral (extrasinusoidal) compartment in the cirrhotic liver. *Histol Histopathol* **14**: 719-727, 1999

**Table 1: Breed, sex and age of dogs with chronic hepatitis and controls**

Identification	Stage of Fibrosis*	Breed	Sex	Age (years)
1	0	Gordon setter	F	4
2	0	Crossbred	M	5
3	0	Rottweiler	M	3
4	0	Miniature Poodle	F	3
5	0	Boxer	M	4
6	1	Bernese mountain dog	M	3
7	1	Schnauzer	F	8
8	1	Golden retriever	F	4
9	1	Standard Poodle	F	8
10	1	Crossbred	F	3
11	2	Shetland	F	13
12	2	Labrador retriever	F	3
13	2	Doberman pinscher	F	2
14	2	American Cocker spaniel	M	4
15	2	Rottweiler	F	3
16	2	Shih tzu	F	9
17	3	Doberman pinscher	M	5
18	3	Great Dane	M	5
19	3	American cocker spaniel	M	5
20	3	Miniature schnauzer	F	12
21	3	German shepherd	M	1

- \* 0 Absence  
 1 Mild portal fibrosis  
 2 Moderate portal fibrosis with mild periportal and septal fibrosis  
 3 Severe portal fibrosis with marked periportal and septal fibrosis or cirrhosis

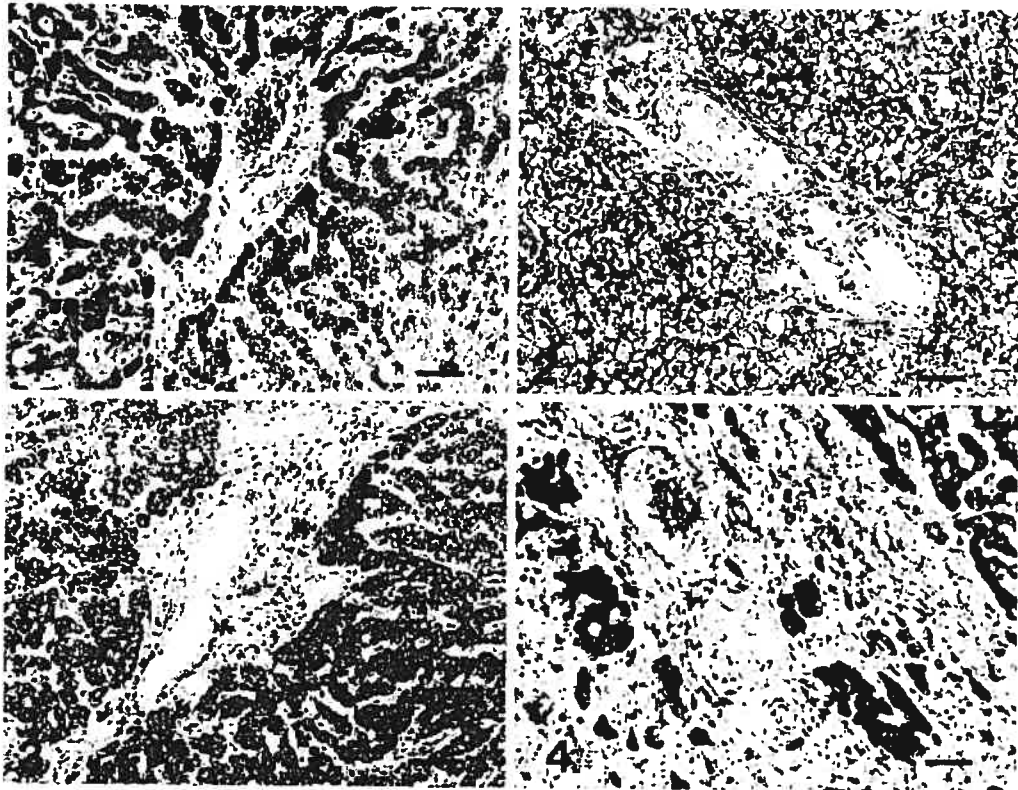
**Table 2: Median values for various histological and immunohistochemical variables in groups of dogs at different stages of chronic hepatitis development**

Variables <sup>*</sup>	Stage of fibrosis <sup>†</sup>				P value‡
	0	1	2	3	
Inflammation	0 <sup>a</sup>	2 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	0.0052
Necrosis	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>b</sup>	1 <sup>ab</sup>	0.0008
Cholestasis	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	0.0066
Bile duct proliferation	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ab</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	0.0005
Lysozyme	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0.7048
$\alpha$ -sma / port <sup>*</sup>	0 <sup>a</sup>	1 <sup>ac</sup>	2 <sup>bc</sup>	3 <sup>b</sup>	0.0004
$\alpha$ -sma / lob	3 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	0.0014
CD3 / port	0 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.0327
CD3 / lob	0 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.0564
$\kappa + \lambda$ / port	0 <sup>a</sup>	0.5 <sup>ab</sup>	4 <sup>b</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	0.0057
Neutrophils / port	0 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup>	11 <sup>b</sup>	1 <sup>ab</sup>	0.0075

<sup>\*</sup> port = per portal space; lob = per lobule;  $\alpha$ -sma =  $\alpha$ -smooth muscle actin;  
 $\kappa + \lambda$  =  $\kappa + \lambda$  light chain + cells

<sup>†</sup> Medians with different letters differ significantly

<sup>‡</sup> P value of Kruskal Wallis H-test



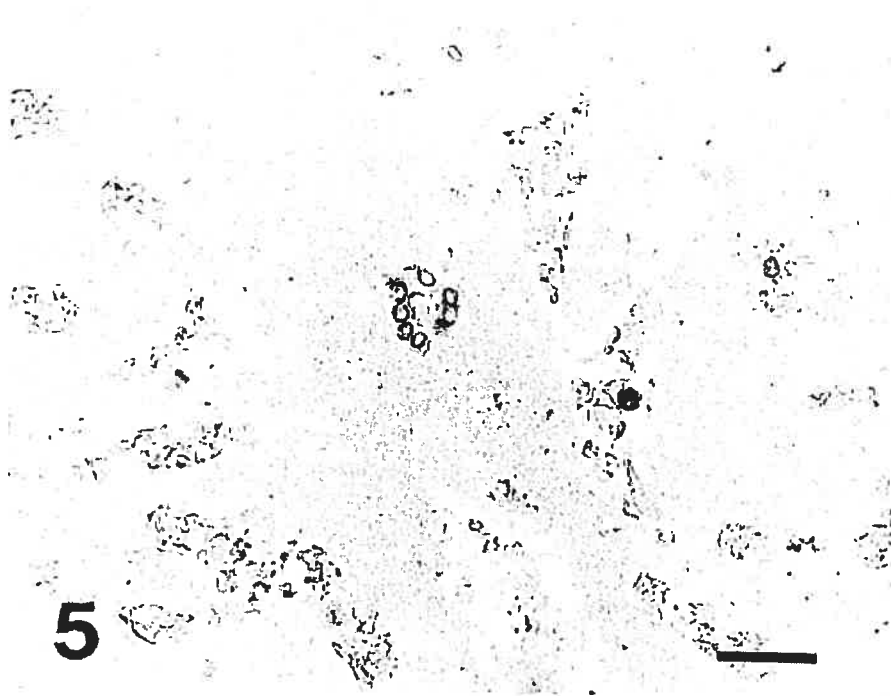
**Fig. 1.** Liver; control dog No. 2. Masson's trichrome. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 2.** Liver; dog No. 7. Stage 1 fibrosis. There is a slight expansion of portal space by fibrous tissue. Masson's trichrome. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Liver; dog No. 11. Stage 2 fibrosis. There is moderate portal fibrosis with mild periportal and septal fibrosis. Masson's trichrome. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Liver; dog No. 18. Stage 3 fibrosis. Portal spaces are severely expanded by fibrous tissue that extends intralobularly, dissecting hepatocytes and surrounding a hyperplastic nodule. Masson's trichrome. Bar = 50  $\mu$ m.





**Fig. 5.** Liver; dog No. 13. Stage 2 fibrosis. Intensely eosinophilic hepatocyte is surrounded by CD3+ lymphocytes. ABC method, CD3 antibody, Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 30  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Liver; control dog No. 2. Intralobular  $\alpha$ -smooth muscle actin reaction is mainly linear, fine, and bordering the perisinusoidal space. ABC method,  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody, Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 7.** Liver; dog No. 13. Stage 1 fibrosis. No sinusoidal  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells are observed. ABC method,  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody, Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 8.** Liver; dog No. 11. Stage 2 fibrosis. Some  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells are observed in the enlarged portal areas and in fibrous septa. ABC method,  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody, Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 50  $\mu$ m.

**Fig. 9.** Liver; dog No. 18. Stage 3 fibrosis. Numerous  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells are observed in and around enlarged portal areas. ABC method,  $\alpha$ -smooth muscle actin antibody, Mayer's hematoxylin counterstain. Bar = 50  $\mu$ m.

## DISCUSSION

Les chiens d'âge moyen et de pure race étaient prédominants dans cette étude. Les femelles prédominaient dans la population canine sélectionnée; cette observation est en accord avec plusieurs autres articles traitant des hépatites chroniques.<sup>9, 12, 26, 31, 32</sup>

Dans la présente étude, les cas ont été regroupés selon le stade de fibrose. La fibrose est un marqueur prédictif bien établi du pronostic lors d'hépatites chroniques humaines.<sup>34, 36</sup> La fibrose a également été reconnue comme facteur de progression lors d'hépatite chez le Doberman.<sup>30</sup>

La cholestase et la prolifération de canaux biliaires progressaient avec le stade de fibrose. La compression exercée sur les canaux biliaires dans les foies déformés par la fibrose et/ou une possible prolifération de canaux biliaires induites par les cytokines pourraient expliquer ce phénomène.<sup>29</sup>

L'activité nécro-inflammatoire tendait à augmenter progressivement aux stades de fibrose 1 et 2 pour ensuite diminuer au stade de fibrose 3. Ceci pourrait indiquer que le processus est actif en phase subaiguë de l'hépatite canine puis qu'il diminue à mesure que l'hépatite progresse vers un stade plus chronique. De plus, selon le test de corrélation de Spearman, la nécrose était positivement corrélée avec le nombre de cellules inflammatoires (les cellules positives au CD3 et aux chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$  ainsi que les neutrophiles).

Au sein des lobules, les lymphocytes CD3+ étaient plus nombreux en région centrolobulaire, tel que noté par Thornburg lors d'hépatites chez les Doberman.<sup>32</sup> Des lymphocytes CD3+ en étroite apposition avec des hépatocytes dégénérés ont été notés dans le foie de huit chiens de différentes races et correspondant tous aux stades de fibrose 1 ou 2. Une corrélation positive entre la nécrose et le nombre de lymphocytes CD3+ portaux et lobulaires a été notée. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un phénomène à médiation immunitaire dans certains cas d'hépatite chronique canine.<sup>31, 32</sup>

La nature de l'infiltrat mononucléaire n'a pas pu être déterminée immunohistochimiquement chez le chien 8, la majorité des cellules mononucléaires étant négatives au CD3 ainsi qu'aux chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$ . Une fixation inadéquate pourrait avoir détérioré les épitopes reconnus par les anticorps du CD3 ainsi que ceux des chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$ . La présence de cellules négatives au CD3 ainsi qu'aux chaînes légères  $\lambda$  et  $\kappa$  pourrait également suggérer l'implication de cellules NK dans de rares cas d'hépatites chroniques canines, mais ceci devra être confirmé par l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement ces cellules.

L' $\alpha$ -actine des muscles lisses est un marqueur pour les cellules d'Ito et les myofibroblastes. Lors de fibrogenèse hépatique chez l'humain et le rat, les cellules d'Ito sont plus nombreuses et se différencient en cellules myofibroblastiques avec forte expression de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses.<sup>5, 16,</sup>

<sup>20, 24, 35</sup> Dans les foies humains et murins normaux, les myofibroblastes ne sont pas confinés aux espaces péricapillaires; ils peuvent également être retrouvés autour des vaisseaux sanguins et des canaux biliaires.<sup>20, 24, 37</sup> Ces myofibroblastes périportaux semblent importants lors de fibrose et de remodelage hépatiques.<sup>20, 37</sup> Lorsqu'activées par différentes cytokines (TGF $\beta$  et PDGF entre autre), les cellules d'Ito et probablement les myofibroblastes périportaux sont qualitativement et quantitativement les plus importantes cellules productrices de matrice extracellulaire lors de maladies hépatiques chroniques chez l'humain et le rat.<sup>5, 15</sup> Les cellules d'Ito humaines activées produisent également un inhibiteur de métalloprotéinase (TIMP-1), diminuant l'activité des collagénases interstitielles et contribuant à l'accumulation de matrice extracellulaire.<sup>5</sup> Tel qu'observé lors de maladies hépatiques chroniques chez l'humain et le rat, les cellules positives à l' $\alpha$ -actine des muscles lisses, correspondant probablement à des myofibroblastes périportaux, tendaient à augmenter dans les espaces portes et les foyers de fibrose parallèlement au stade de fibrose. Tel que noté lors d'hépatite chronique humaine, l'expression sinusoidale de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (cellules d'Ito) augmentait dans les régions lobulaires adjacentes aux foyers de fibrose, principalement autour des espaces portes et des septas élargis par la fibrose.<sup>35</sup> L'absence de cellules positives dans les foyers d'hyperplasie nodulaire pourrait être due à un manque de migration des cellules d'Ito durant la régénération hépatique. Selon le test de corrélation de Spearman, la

densité de cellules positives à l' $\alpha$ -actine des muscles lisses dans les espaces portes était corrélée avec l'inflammation, la prolifération de canaux biliaires et la fibrose. Ces résultats pourraient suggérer que l'inflammation dans le foie canin, comme chez l'humain et le rat, est associée avec l'activation de myofibroblastes périductulaires et possiblement à la prolifération de canaux biliaires.<sup>5, 15, 29</sup>

Lors de maladies hépatiques chez l'humain et la souris, les cellules de Kupffer sont une source de TNF $\beta$  et cette cytokine est partiellement responsable de l'activation des myofibroblastes et des lymphocytes T.<sup>5, 8, 27</sup> Dans cette étude, il n'y avait pas de différence entre les foies affectés et contrôles en ce qui regarde la présence de cellules intrasinusoïdales positives au lysozyme. Le rôle des cellules de Kupffer dans les hépatites canine reste à être déterminé.

Il serait intéressant de vérifier la progression de l'hépatite chronique chez le chien en se servant des marqueurs utilisés dans la présente étude afin de leur attribuer si possible une valeur pronostique.

De même, ces marqueurs pourraient être utilisés pour suivre la modification de la réponse inflammatoire suite au traitement.

## CONCLUSION

En conclusion, de nombreuses races de chiens étaient affectées et les femelles d'âge moyen prédominaient dans les cas sélectionnés d'hépatite chronique canine. L'activité nécro-inflammatoire augmentait progressivement pour ensuite diminuer à mesure que l'hépatite progressait vers la cirrhose. La prédominance de lymphocytes CD3+ et la présence d'hépatocytes dégénérés entourés par ces cellules dans plusieurs cas d'hépatites en phase active sont fortement suggestives d'un processus à médiation immunitaire. Les myofibroblastes périductulaires semblent jouer un rôle important lors de la fibrogenèse hépatique chez le chien.



**BIBLIOGRAPHIE**

1. Baptista A, Bianchi L, De Groote J, et al. : The diagnostic significance of periportal hepatic necrosis and inflammation. *Histopathol* **12** : 569-579, 1988
2. Batts KP, Ludwig J : Chronic hepatitis : an update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* **19** : 1409-1417, 1995
3. Bennet AM, Davies JD, Gaskell CJ, Lucke VM : Lobular dissecting hepatitis in the dog. *Vet Pathol* **20** : 179-188, 1983
4. Bishop L, Strannberg JD, Adams RJ, et al. : Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospire. *Am J Vet Res* **40** : 839-844, 1979
5. Burt AD : Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* **170** : 105-114 1993
6. Center SA : Chronic liver disease: current concepts of disease mechanisms. *J Small Anim Pract* **40** : 106-114, 1999
7. Chouinard L, Martineau D, Forget C, Girard C: Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis and cirrhosis. *J Vet Diagn Invest* **10** : 320-325, 1998
8. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: The liver and the biliary tract. *In: Pathologic basis of disease*, 6th ed., WB Saunders, Philadelphia, PA, pp. 845-901, 1999.
9. Crawford MA, Schall WD, Jensen RK, Tasker JB: Chronic active hepatitis in 26 Doberman Pinschers. *J Am Vet Med Assoc* **187** : 1343-1350, 1985

10. Desmet VJ : Histological classification of chronic hepatitis. *Acta Gastroenterol Belg* **60** : 259-267, 1997
11. Doige C, Lester S : Chronic active hepatitis in dogs : a review of fourteen cases. *J Am Anim Hosp Assoc* **17** : 725-730, 1981
12. Fuentealba C, Guest S, Haywood S, Homey B : Chronic hepatitis : a retrospective study in 34 dogs. *Can Vet J* **38** : 365-373, 1997
13. Gocke DJ, Morris TQ, Bradley SE : Chronic hepatitis in dogs : the role of immune factor. *J Am Vet Med Assoc* **156** : 1700-1705, 1970
14. Gocke DJ, Preiseg R, Morris TQ, et al. : Experimental viral hepatitis in the dog : the production of persistent disease in partially immune animals. *J Clin Invest* **46** : 1506-1517, 1967
15. Gressner AM : Hepatic fibrogenesis : the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol* **30** : 5-16, 1992
16. Hautekeete ML, Geerts A : The hepatic stellate (Ito) cell : its role in human liver disease. *Virchow's Arch* **430** : 195-207, 1997
17. Jarret WHF, O'Neil BW : A new transmissible agent causing acute hepatitis, chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. *Vet Rec* **116** : 629-635, 1985
18. Jones TC, Hunt RD, King NW : The digestive system. *In: Veterinary pathology*, 6th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MA, pp. 1043-1110, 1997

19. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N : The liver and biliary system. *In:* Pathology of domestic animals. Vol 2, 4th ed., San Diego, CA, pp. 319-406, 1993
20. Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, et al.: Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers : distinct roles of myofibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* **112** : 387-401, 1999
21. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. : Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* **5** : 431-435, 1981
22. Laskin DL: Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Tox Path* **24** : 112-115, 1996
23. MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, et al.: Pathophysiology of the liver. *In:* Pathology of the liver. 4th ed. Churchill Livingstone, London, UK, pp. 67-106, 2002
24. Nouchi T, Takana Y, Tsukada T, Sato C, Marumo F : Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* **11** : 100-105, 1991
25. Poffenbarger EM, Hardy RM : Hepatic cirrhosis associated with long term primidone therapy in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **186** : 978-980, 1985
26. Rutgers HC, Haywood S : Chronic hepatitis in the dog. *J Small Anim Pract* **29** : 679-690, 1988

27. Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G: Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* **157** : 1671-1683, 2000
28. Sevelius E, Anderson M, Jönson L : Hepatic accumulation of alpha-1-antitrypsine in chronic liver disease. *J Comp Pathol* **111** : 401-412, 1994
29. Slott PA, Liu MH, Tavoloni N: Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* **99** : 466-477, 1990
30. Speeti M, Eriksson J, Saari S, Westermarck E : Lesions of subclinical Doberman hepatitis. *Vet Pathol* **35** : 361-369, 1998
31. Strombeck DR, Gribble DG : Chronic active hepatitis in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* **173** : 380-386, 1978
32. Thornburg LP : Histomorphological and immunohistochemical studies of chronic active hepatitis in Doberman Pinscher. *Vet Pathol* **35** : 380-385, 1998
33. Thornburg LP, Shaw D, Dolan M, et coll. : Hereditary copper toxicosis in West Highland White terriers. *Vet Pathol* **23** : 148-154, 1986
34. Vaquer P, Canet R, Llompant A, et al. : Histological evolution of chronic hepatitis C : factors related to progression. *Liver* **14** : 265-269, 1994
35. Yamaoka K, Nouchi T, Marumo P, Sato C : Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers. *Dig Dis Sci* **38** : 1473-1479, 1993

36. Yano M, Kumada H, Kage M, et al. : The long term evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23** : 1334-1340, 1996
37. Zimmermann A, Zimmermann H, Fellay M, Reichen J: Cells with morphological and immunohistochemical features of hepatic stellate cells (Ito cells) form an extralittoral (extrasinusoidal) compartment in the cirrhotic liver. *Histol Histopathol* **14** : 719-727, 1999





## ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Julie BOISCLAIR		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Pathologie

### DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> Boisclair, Julie, Monique Doré, Guy Beauchamp, Luc Chouinard et Christiane Girard	
<b>Titre</b> Characterization of the inflammatory infiltrate in canine chronic hepatitis	
<b>Revue</b> Veterinary Pathology	<b>Date de publication</b> Décembre 2001

### DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b> <i>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Julie BOISCLAIR inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire lors d'hépatite chronique canine</i>	
<b>Coauteur</b> Guy Beauchamp	<b>Date</b> 9/01/04
<b>Coauteur</b> Luc Chouinard	<b>Date</b> 23 01 04
<b>Coauteur</b> Monique Doré	<b>Date</b> 9/01/04
<b>Coauteur</b> Christiane Girard	<b>Date</b> 9/01/04





## The American College of Veterinary Pathologists™

7600 Terrace Avenue, Suite 203 • Middleton, WI 53562-3174 USA • Phone: (608) 833-8725  
Fax: (608) 831-5122 • E-Mail: [info@acvp.org](mailto:info@acvp.org) • Website: <http://www.acvp.org>

*President*

**Linda Munson, DVM, PhD**  
*University of California-Davis  
Davis, CA*

*Vice-President/President-Elect*

**R. Keith Harris, DVM**  
*Wyeth Research  
Chazy, NY*

*Secretary-Treasurer*

**Paul C. Stromberg, DVM, PhD**  
*Ohio State University  
Columbus, OH*

*Immediate Past President*

**Harold Davis, DVM, PhD**  
*Amgen, Inc.  
Thousand Oaks, CA*

*Councilors:*

**Margaret A. Miller, DVM, PhD**  
*Purdue University  
West Lafayette, IN*

**Evan B. Janovitz, DVM, PhD**  
*Bristol-Myers Squibb Co.  
Princeton, NJ*

**John M. Cullen, VMD, PhD**  
*North Carolina State University  
Raleigh, NC*

**Robert L. Hall, DVM, PhD**  
*Covance Laboratories Inc.  
Madison, WI*

*Executive Director*

**Mary A. Schumacher**

January 19, 2004

Dr Julie Boisclair (AS Dr Christiane Girard)  
Department of Pathology  
Fac. Veterinary Medicine  
3200 Sicotte  
St-Hyacinthe, Quebec  
Canada  
J2S 7C6

Dear Dr. Boisclair:

The American College of Veterinary Pathologists grants you permission for reproduction in English the following material for inclusion in your Master's thesis:

J. Boisclair; M. Doré; G. Beauchamp; L. Chouinard; C. Girard.  
Characterization of the inflammatory infiltrate in canine chronic hepatitis.  
Vet Pathol 2001 38: 628-635.

Sincerely,

  
Mary A. Schumacher  
Executive Director

cc: Dr. Eva Sartin  
Editor-in-Chief, *Veterinary Pathology*

