



HAL
open science

Prise en charge chirurgicale de l'obèse et de l'obèse morbide : conséquences sur la stéatopathie métabolique et sur l'accès à la transplantation hépatique

Guillaume Lassailly

► To cite this version:

Guillaume Lassailly. Prise en charge chirurgicale de l'obèse et de l'obèse morbide : conséquences sur la stéatopathie métabolique et sur l'accès à la transplantation hépatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS027 . tel-03414168

HAL Id: tel-03414168

<https://theses.hal.science/tel-03414168>

Submitted on 4 Nov 2021

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.



UNIVERSITE DE LILLE

Année : 2020

**Prise en charge chirurgicale de l'obèse et de l'obèse morbide :
Conséquences sur la stéatopathie métabolique et sur l'accès à la
transplantation hépatique**

Présentée et soutenue publiquement
le 16 Décembre 2020 à 13h au Pôle Recherche par
Guillaume LASSAILLY

JURY

Rapporteur :

Monsieur le Professeur Rodolphe ANTY

Monsieur le Professeur Jérôme BOURSIER

Président du Jury :

Madame le Professeur Réjane LESTRELIN-PAUMELLE

Assesseurs :

Madame le Professeur Valérie PARADIS

Invité d'honneur :

Monsieur le Professeur Philippe MATHURIN

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Sébastien DHARANCY

Monsieur le Docteur Laurent DUBUQUOY

*A Anahita,
Darius,
Ariane,
et Mithra,
Je vous aime.*

Remerciements

A mes Maîtres et juges et rapporteurs,

Monsieur le Professeur Rodolphe Anty

Vous me faites l'honneur d'examiner et rapporter mon travail

Soyez assuré de ma reconnaissance et de ma gratitude.

Cher Rodolphe je te remercie pour tes nombreux conseils et aussi pour nos discussions lors de nos rencontres. La première était il y a presque 10 ans, en 2011 en qualité de « photographe » de l'AASLD. Tant de chemin parcouru. Merci d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.

Monsieur le professeur Jérôme Boursier,

Vous me faites l'honneur d'examiner et rapporter mon travail

Soyez assuré de ma reconnaissance et de ma gratitude.

Cher Jérôme, je te remercie d'avoir accepté avec enthousiasme de rapporter mon travail. J'espère que ces quelques 250 pages ne l'entameront pas. Au besoin, je pourrais trouver un bon carburant à la friterie « sensas ». Par ailleurs, je ne te cache pas le bonheur du Dr Dubuquoy d'avoir enfin sur un vrai supporteur du RCL parmi les membres du jury.

Madame le Professeur Réjane Lestrelin-Paumelle

Vous me faites l'honneur de participer et d'évaluer mon travail

Soyez assurée de ma gratitude et de mon respect.

Chère Réjane, merci de ta confiance à mon égard ces dernières années que ce soit pour les journées thématiques et tes sollicitations dans tes nombreux projets. Ce travail maintenant rendu, j'ai bien peur de ne plus avoir beaucoup d'excuses pour le Badminton.

Madame le Professeur Valérie Paradis

Vous me faites l'honneur de participer et d'évaluer mon travail

Soyez assurée de ma gratitude ainsi que de mon admiration pour votre travail.

Un très chaleureux merci pour avoir acceptée de participer à mon jury de thèse, malgré vos nombreuses sollicitations.

Cher maître, Monsieur le Professeur Philippe Mathurin

Vous me faites l'honneur de participer à mon jury

Soyez assuré de ma reconnaissance dans l'accomplissement de ce je suis
aujourd'hui.

« La grandeur d'un homme ne se mesure pas à la richesse qu'il acquiert mais à son intégrité et à sa capacité à affecter positivement les gens autour de lui. » Bob Marley.

Cher maître, Monsieur le Docteur Laurent Dubuquoy

Vous m'avez accompagné et dirigé dans la conduite de cette thèse

Soyez assuré de ma reconnaissance.

Merci Laurent pour ta disponibilité et ton calme « analytique » qui ont été pour moi une leçon dans la conduite de l'expérimentation scientifique. De même que tu ne confonds pas vitesse et précipitation, tu ne te méprends pas entre réactivité et gesticulation. Amitiés

Cher maître, Monsieur le Professeur Sébastien Dharancy

Vous m'avez guidé et soutenu dans la conduite de cette thèse et bien au-delà

Soyez assuré de ma gratitude.

« Toujours par deux ils vont, ni plus, ni moins... Le maître et son apprenti » Yoda.
J'ai encore quelques leçons. Ton Padawan.

SOMMAIRE

Contenu

| | |
|---|----|
| PARTIE 1 Généralités sur la stéatopathie métabolique | 15 |
| Introduction..... | 15 |
| 1. Définition de la stéatopathie métabolique..... | 15 |
| 2. Diagnostic | 16 |
| a. La stéatose..... | 16 |
| b. La stéatohépatite non alcoolique, diagnostic histologique..... | 19 |
| 3. Tests non-invasifs et stéatopathie métabolique..... | 23 |
| a. Tests non-invasifs de dépistage de la stéatose..... | 23 |
| b. Tests non-invasif de la NASH..... | 24 |
| c. Tests non-invasif de fibrose | 25 |
| Epidémiologie de la stéatopathie métabolique..... | 27 |
| 1. Incidence et Prévalence de la stéatopathie métabolique..... | 28 |
| a. Incidence | 28 |
| b. Prévalence | 28 |
| c. Projection de la NAFLD et de son impact sur la santé publique..... | 29 |
| 2. Facteurs de risque de la stéatopathie métabolique..... | 30 |
| a. L'âge | 30 |
| b. Prédisposition et facteurs génétiques..... | 31 |
| c. Diabète de type 2 | 33 |
| d. Obésité..... | 33 |
| Partie 2 : Histoire naturelle de la stéatopathie métabolique..... | 37 |
| Histoire Naturelle de la stéatopathie métabolique..... | 37 |
| 1. Facteur de risque de mortalité de la stéatopathie métabolique..... | 38 |
| 2. Mortalité hépatique et histologie hépatique | 38 |
| 3. Evolution de la stéatose simple | 40 |
| 4. Evolution de la NASH | 40 |
| 5. Cirrhose..... | 41 |
| 6. Carcinome hépatocellulaire..... | 41 |
| Partie 3 : Physiopathologie | 43 |

Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH : lien étroit entre NAFLD et

| | |
|--|----|
| l'insulinorésistance. | 43 |
| 1. Rappel physiologique : mécanisme d'action de l'insuline..... | 44 |
| a. Mécanismes d'action de l'insuline dans le muscle squelettique. | 45 |
| b. Mécanismes d'action de l'insuline dans le foie..... | 46 |
| c. Mécanismes d'action de l'insuline dans le tissu adipeux (graisse blanche). | 48 |
| 2. Insulinorésistance. | 50 |
| a. Insulinorésistance musculaire..... | 51 |
| b. Insulinorésistance hépatique : Paradoxe | 52 |
| c. Genèse de l'insulinorésistance : de l'obésité, à la NAFLD et au diabète. | 53 |
| Lipides intra hépatiques et insulinorésistance : DAG, céramides | 56 |
| Partie 4 : Prise en charge de la stéatopathie métabolique. | 58 |
| 1. Généralités..... | 58 |
| 2. Traitements la stéatohépatite métabolique, NASH..... | 60 |
| Manuscrit: Perspectives on treatment for non-alcoholic steatohepatitis..... | 60 |
| 3. Actualisation des données concernant les traitements pharmacologiques de la NASH. .. | 61 |
| a. Traitement anti-fibrosant..... | 61 |
| b. Traitement anti-oxydants | 62 |
| c. Traitement multi-cibles et régulateurs du métabolisme énergétique. | 62 |
| d. Avancés dans le traitement de la cirrhose NASH..... | 64 |
| e. La chirurgie bariatrique, une alternative au traitement pharmacologique ?..... | 65 |
| Efficacité de la chirurgie bariatrique sur la NASH chez l'obèse morbide..... | 67 |
| Etude 1. Effet de la chirurgie bariatrique chez les patients présentant une NASH histologiquement prouvée. | 67 |
| Etude 2. La chirurgie bariatrique permet la rémission de la NASH et la régression de la fibrose à long terme. | 69 |
| Manuscrit du protocole NASHsurg : Etude de la chirurgie bariatrique comme traitement des formes sévères de NASH chez l'obèse non morbide. PHRC Nationale (étude NASHsurg)..... | 71 |
| 4. Prise en charge de stéatopathie métabolique et de l'obésité dans le contexte de la transplantation hépatique. | 72 |
| a. Impact de l'obésité chez les candidats à la greffe hépatique..... | 72 |
| b. Données locales (CHU de Lille) sur l'évolution de l'obésité chez les candidats à la transplantation hépatique. | 73 |
| c. . Données nationales « CRISTAL » sur l'impact de l'obésité morbide chez les candidats à la transplantation hépatique. | 74 |
| Etude 3. Severe obesity increases death and dropout from the liver waiting list: a cohort analysis using the French national CRISTAL database..... | 75 |
| PARTIE 5 : Greffons stéatosiques marginaux et ischémie reperfusion hépatique. | 77 |

| | |
|--|-----|
| 1. Ischémie reperfusion hépatique | 78 |
| a. Facteurs cliniques influençant la sévérité et le processus lésionnel de l'IR | 78 |
| Facteurs liés au donneur..... | 78 |
| Conséquences de la mort encéphalique et des conditions cliniques préalables au prélèvement | 79 |
| b. Physiopathologie de l'IR..... | 79 |
| Grands principes physiopathologiques de l'ischémie reperfusion hépatique. | 80 |
| Implications cellulaires au cours du processus lésionnel de l'ischémie reperfusion..... | 82 |
| c. Mécanismes lésionnels..... | 84 |
| Mécanismes de prévention des lésions d'hypoxie : HIF | 84 |
| Autophagie | 85 |
| Pathogen Recognition Receptor (PRR) | 86 |
| 2. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 1, acteur et cible de regulation de l'ischémie reperfusion. | 87 |
| a. NOD1 membre de la famille des NLR : Structure et signalisation intracellulaire de NOD1..... | 87 |
| b. La voie de signalisation induite par NOD1..... | 89 |
| c. Implication de NOD1 dans l'immunité et la défense anti-infectieuse..... | 91 |
| d. Implication de la voie NOD1 sur la fonction du PNN et conséquence sur l'ischémie- reperfusion hépatique..... | 92 |
| Etude du rôle hépatique de NOD1 dans la modulation lésionnelle au cours de l'ischémie reperfusion hépatique. | 94 |
| Partie 6. Discussion | 96 |
| 1. Problématiques générales de la prise en charge de la stéatopathie métabolique..... | 96 |
| 2. Perspectives et application thérapeutique potentielle de la voie NOD1..... | 102 |
| Conclusion | 105 |
| Références..... | 106 |

Résumé de la thèse.

L'obésité est dorénavant considérée comme une maladie par l'OMS et touche l'ensemble du globe. Responsable d'une diminution de l'espérance de vie en raison de l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire et carcinologique, l'obésité a des conséquences métaboliques endocrines avec la survenue du diabète de type 2 et hépatiques avec la stéatopathie métabolique. La stéatopathie métabolique et notamment sa forme sévère, la NASH, provoquent l'accroissement du nombre de cirrhose et du carcinome hépatocellulaire. La prise en charge de la stéatopathie métabolique implique de considérer le traitement de l'obésité. La chirurgie bariatrique apparaît aujourd'hui comme le meilleur traitement de l'obésité. Chez le patient atteint de stéatohépatite, la chirurgie bariatrique permet la résolution de la NASH dans près 80% des cas. La disparition du processus inflammatoire initie la diminution de la fibrose. L'importance de la réponse histologie est associée à la perte de poids et à l'amélioration de l'insulinorésistance. Après 5 ans de suivi, il n'y a pas de récurrence de la maladie, et la fibrose continue de s'améliorer. A titre d'exemple, la fibrose disparaît totalement chez près de 45% des patients atteints de fibrose avancée à baseline. Pour les patients souffrants de carcinome hépatocellulaire et/ou d'insuffisance hépatocellulaire, la greffe apparaît comme le traitement de référence. Néanmoins, l'analyse du devenir sur liste d'attente prétransplantation des patients révèle que les patients obèses morbides ont plus de risque de mortalité sur liste, et moins d'accès à la greffe. Cet effet n'est pas dû à une plus faible attribution des greffons, mais à un taux de refus plus important en raison d'incompatibilités morphologiques entre le donneur et le receveur. Idéalement, il faudrait pouvoir proposer des greffons provenant de donneurs obèses à ces receveurs, mais ces premiers sont stéatosiques et plus sensibles à l'ischémie reperfusion. La modulation de l'ischémie reperfusion apparaît comme un enjeu majeur pour améliorer l'accès à la greffe, en utilisation des greffons dit marginaux. La protéine NOD1 semble être une cible idéale pour réduire le processus lésions de l'ischémie reperfusion. A l'échelle hépatique, la voie NOD1 influence l'expression des molécules d'adhérences ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales et des hépatocytes. Les antagonistes NOD1 réduisent ainsi l'expression de ICAM-1 et VCAM-1, l'interaction entre hépatocytes et polynucléaires neutrophiles et ainsi que les aires de nécrose hépatique secondaire à la l'ischémie reperfusion. NOD1 se positionne comme une cible intéressante méritant d'être évalué sur des foies stéatosiques afin de les protéger du processus lésionnel de l'ischémie reperfusion.

Abstract

Obesity is now considered as a disease by WHO with a Global threat. Responsible for a decrease in life expectancy due to increased cardiovascular and carcinologic mortality, obesity has endocrine metabolic consequences with the onset of type 2 diabetes and hepatic consequences with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD and in particular its severe form, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cause an increase in the number of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Management of NASH involves considering treatment for obesity. Bariatric surgery is emerging as the best treatment for obesity today. In patients with steatohepatitis, bariatric surgery resolves NASH in nearly 80% of cases. The disappearance of the inflammatory process initiates the decrease in fibrosis. The magnitude of the histological response is associated with weight loss and improvement in insulin resistance. After 5 years of follow-up, there is no recurrence of the disease, and the fibrosis continues to improve. For example, fibrosis resolves completely in nearly 45% of patients with advanced baseline fibrosis. For patients suffering from hepatocellular carcinoma and / or hepatocellular insufficiency, the liver transplantation appears to be the best therapeutic option. Nonetheless, analysis of the pre-transplant waiting list outcome of patients reveals that morbidly obese patients have a higher risk of on-list mortality, and less access to transplantation. This effect is not due to a lower allocation of grafts, but to a higher refusal rate due to morphological incompatibilities between the donor and the recipient. Ideally, it should be possible to offer grafts from obese donors to these recipients, but the formers disclose frequently steatosis and thus more susceptible to ischemia reperfusion. The modulation of ischemia reperfusion appears to be a major issue in improving access to grafts, using so-called marginal grafts. The NOD1 protein appears to be an ideal target for reducing the ischemia reperfusion injury process. At the hepatic level, the NOD1 pathway influences the expression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules on the surface of endothelial cells and hepatocytes. The NOD1 antagonists thus reduce the expression of ICAM-1 and VCAM-1, the interaction between hepatocytes and polymorphonuclear neutrophils and as well as the areas of hepatic necrosis secondary to ischemia reperfusion. NOD1 is positioned as an interesting target deserving to be evaluated on fatty livers in order to protect them from the injury process of ischemia reperfusion.

PARTIE 1 Généralités sur la stéatopathie métabolique

Introduction

1. Définition de la stéatopathie métabolique

La première description de la stéatopathie métabolique remonte à 1980. Ludwig et al, publient la description de 20 patients ayant des caractéristiques histologiques compatibles avec celles de consommateurs excessifs d'alcool, mais sans pour autant présenter d'antécédent de consommation excessive (1). Les auteurs décrivent, après exclusion des autres pathologies hépatiques, un phénotype métabolique commun à l'ensemble des patients : obésité, diabète et dyslipidémie. La pathologie se caractérise histologiquement par une stéatose significative associée à une inflammation et une fibrose. Bien que la stéatose apparaisse comme l'atteinte histologique princeps, elle n'est pas spécifique de la stéatopathie métabolique.

Cependant, la distinction entre la stéatose à prédominance macrovacuolaire de la microvacuolaire peut orienter le diagnostic. Les macrovacuoles lipidiques sont plus volontiers en lien avec des étiologies de surcharge ou métabolique (exemple : excès d'apport en hydrate de carbone). Les causes de stéatose microvacuolaire, plus rares, s'associent généralement à des étiologies toxiques, virale ou génétique responsable d'un stress mitochondrial affectant la β -oxydation des acides gras (ex : stéatose aiguë gravidique, hépatite médicamenteuse, syndrome de Reye ...).

Ainsi, de multiples causes engendrent la stéatose. De manières non exhaustives, la stéatose peut être secondaire à la maladie alcoolique du foie, des virus comme le VHC ou le VHB, des médicaments, des pathologies génétiques héréditaires, des toxiques (métaux,

lourds), dénutrition, nutrition parentérale et naturellement la stéatopathie métabolique. Les grandes causes de stéatose sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

Tableau Causes de stéatose hépatiques (liste non exhaustive)

| Causes de stéatose | |
|-------------------------------------|---|
| Maladies hépatiques | Maladie génétique |
| Alcool | maladie de Wilson |
| Hépatite virale B, C | Abétalipoprotéïnémie |
| Médicaments | Galactosémie |
| Amiodarone | Glycogénose |
| antirétroviraux (AZT) | maladie de Wolman, déficit en LAL |
| Tamoxifène | Tyrosinémie |
| glucocorticoïdes | Homocystinurie |
| Méthotrexate | Steatopathie métabolique |
| tetracycline | Sd métabolique, Obésité, Insulinorésistance |
| Bleomycine | Dyslipidémie |
| Œstrogène | TM6SF2 |
| Toxiques : Barium, Phosphore | |

La steatopathie métabolique constitue l'atteinte hépatique stéatosique la plus fréquente (2-4). Les sociétés savantes internationales de l'EASL (European Association for the Study of the Liver) et de l'AASLD (American Association for the Study of Liver Disease) définissent la stéatopathie métabolique comme une entité nosologique avec différentes formes clinico-pathologiques distinctes (2,5). La forme dit simple, peu évolutive, non inflammatoire et sans fibrose significative correspond à la stéatose. La forme évolutive et inflammatoire, correspond à la stéatohépatite non alcoolique ou NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis) qui progresse vers la cirrhose (6-8). Aujourd'hui seule l'analyse histologique de la biopsie hépatique permet de diagnostiquer et de préciser les différents formes clinico-pathologiques de la stéatopathie métabolique (9,10).

2. Diagnostic

a. La stéatose

La stéatose hépatique est une entité histopathologique fréquente dont la principale cause s'intègre au syndrome d'insulino-résistance plus communément dénommé syndrome métabolique. L'identification de la stéatose et son diagnostic étiologique sont généralement aisés. Pour retenir le diagnostic de stéatose métabolique, les causes non métaboliques, telle que les virus, ou des atteintes médicamenteuses mais surtout la stéatose secondaire à la consommation excessive d'alcool devront être exclues. La présence d'une stéatose métabolique caractérise la stéatopathie métabolique ou non alcoolique, correspondant au terme anglo-saxon NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*).

La stéatose se diagnostique au moyen des examens d'imageries simples, disponibles, validés et reproductibles comme l'échographie abdominale ou grâce à l'analyse histologique.

Diagnostic microscopique de la stéatose

La stéatose se définit histologiquement par une accumulation cytoplasmique de vacuoles lipidiques dans l'hépatocyte. Elle devient pathologique lorsqu'elle concerne plus de 5% des hépatocytes (1).

A l'analyse microscopique, après inclusion en paraffine, les vacuoles apparaissent optiquement vides, suite à la dilution des triglycérides les composants (après contact avec les solvants utilisés pendant la fixation). Pour être visualisée, les prélèvements doivent être conditionnés à l'état frais et colorées au *noir Soudan* ou *Rouge à l'huile*. Les lésions stéatosiques peuvent atteindre l'ensemble du parenchyme hépatique, mais se concentre préférentiellement dans les régions centrolobulaires chez les patients métaboliques. La taille des vacuoles lipidiques permet d'en distinguer deux formes, l'une fréquente la stéatose macrovacolaire, l'autre plus rare la stéatose microvacolaire. Les macrovacuolaires lipidiques repoussent le noyau cellulaire en périphérie de l'hépatocyte. A l'inverse les

microvacuoles, de très petites tailles ne refoulent pas le noyau qui reste en position centrale dans l'hépatocyte.

Composition lipidique de la stéatose

Les vacuoles lipidiques se composent à plus de 90% de triglycérides [triacylglycérol (TAG)] et environ 10% d'un mélange de mono-acylglycérol, de diacylglycérol (DAG) et d'acide gras libre. Dans une moindre mesure, on retrouve également du cholestérol libre, des esters de cholestérol ainsi que des phospholipides (lécithines/phosphatidylcholine). La composition lipidique hépatique des vacuoles semble varier en fonction de l'atteinte nosologique de la stéatopathie métabolique. Si la quantité de TAG et de DAG augmente de manière attendue et pathologique au cours de la stéatose et la NASH, le ratio de TAG/DAG se modifie (foie normal vs. stéatose vs. NASH: 7 vs. 26 vs. 31, $p < 0,001$). Le contingent d'acides gras libres se raréfie en acides gras poly-insaturés Ω -3 et Ω -6 avec la sévérité de la stéatopathie. De plus, la stéatose et la NASH s'accompagnent aussi d'un enrichissement en cholestérol libre et d'un appauvrissement en phosphatidylcholine (11). Ces modifications de la composition lipidique de la stéatose entraînent diverses conséquences. Ainsi l'appauvrissement en phosphatidylcholine participe à l'enrichissement en cholestérol libre dans la composition de la bile, favorisant la lithogénèse. De nombreux auteurs soulignent ainsi le lien entre lithiase biliaire et stéatopathie métabolique (12,13).

Diagnostic macroscopique de la stéatose

Les outils non-invasifs radiologiques comme l'échographie hépatique et la spectroscopie par résonance magnétique (H-SRM) ou MRI-PDFF (*magnetic resonance imaging-derived proton density fat fraction*), ainsi que l'IRM en opposition de phase peuvent être utilisées pour le diagnostic de stéatose. Le H-SRM, au même titre que la biopsie hépatique, permet de diagnostiquer de manière certaine la présence d'une stéatose. Le taux de lipide intra-hépatique mesuré doit être supérieur à 5,6% (5,14). L'accessibilité difficile de H-

SRM réduit son utilisation en pratique courante. Le diagnostic repose plus fréquemment sur l'échographie hépatique, qui possède une bonne valeur prédictive positive pour les foies présentant une stéatose supérieure à 20-30%. Néanmoins, la performance diminue nettement en cas de stéatoses inférieure à 20% des hépatocytes (15).

Le H-SRM connaît un essor important dans le cadre d'essai clinique. La Food and Drug Administration (FDA) en reconnaît la validité et la reproductibilité (16). Dans le cadre de la recherche, l'H-SRM devient un outil d'évaluation des thérapeutiques dans la NAFLD au cours de phase de développement de phase II afin de démontrer l'efficacité sur la réduction de la stéatose. Grâce à sa mesure qualitative et son caractère non invasif, elle réduit les tailles d'effectifs et le recours à la biopsie hépatique (17–19). A titre d'exemple, Ezetimibe (essai randomisé MOZART) a été évalué dans la NAFLD grâce à ce moyen. Son inefficacité sur la réduction de la stéatose a arrêté tout développement de la molécule dans la NAFLD et la NASH (20).

b. La stéatohépatite non alcoolique, diagnostic histologique.

La stéatohépatite non alcoolique, connue également sous sa dénomination anglo-saxonne « Non-Alcoholic Steatohepatitis » et de son acronyme « NASH », correspond à la forme évolutive de la stéatopathie métabolique. Son diagnostic est exclusivement histologique (9,10,21).

L'établissement d'un diagnostic requiert une biopsie hépatique de « qualité », obtenue au moyen d'une aiguille de 16-18 Gauge, préférentiellement dans le lobe hépatique droit. La taille idéale recommandée est de 20 mm associée à au moins 10 espaces porte (16), Des tailles inférieures à 8 mm sont fortement découragées et présentent un risque important de faux négatifs.

L'anatomopathologiste établit le diagnostic grâce à l'identification de trois lésions histologiques essentielles. Le diagnostic requiert l'association d'une stéatose, d'une ballonnisation hépatocytaire et d'une inflammation lobulaire (2,5,9,21). D'autres signes sémiologiques appartiennent à la constellation lésionnelle de la maladie, mais ne sont pas indispensables au diagnostic (inflammation portale, infiltrats polymorphes à prédominance de polynucléaires, corps de Mallory-Denk, corps apoptotiques, vacuoles cytoplasmiques claires, mégamitochondries, lipogranulome et noyaux glycogéniques). Parmi tous ces signes histologiques le plus spécifique de stéatohépatite reste la ballonnisation hépatocytaire (8,22). La fibrose ne fait pas partie des critères diagnostiques. Toutefois, l'inflammation portale, tout comme la ballonnisation hépatocytaire semble être associée au pronostic de la maladie, bien qu'elle ne fasse pas partie du triptyque diagnostique de la NASH (8).

Deux définitions ou classifications sont aujourd'hui disponibles. La définition utilisée par le NASH-CRN et suivie par l'AASLD est détaillée dans le tableau 1a et distingue trois grandes entités nosologiques : la NASH, la « borderline NASH » et la stéatose (23). L'EASL recommande et utilise le SAF score établi par le consortium européen FLIP (Fatty Liver Inhibition of Progression), détaillé dans le tableau 1b (5). Leur principale différence est que le consortium FLIP ne retient pas le concept du « borderline NASH ». Le score SAF s'est construit prospectivement et semble avoir une meilleure concordance inter-observateur comparativement à la classification du NASH-CRN (22).

Tableau 1a : Critères diagnostiques des stéatopathies non alcooliques

| Diagnostic | Stéatose macrovacuolaire | Ballonnisation | Zone | Inflammation Lobulaire | Inflammation portale |
|-------------------------------|--------------------------|----------------|------|------------------------|----------------------|
| NASH | + | + | 3 | + | ± |
| Borderline NASH zone 3 | + | - | 3 | + | ± |
| Borderline NASH zone 1 | + | - | 1 | ± | + |
| Stéatose | + | - | | ± | ± |
| Pas de stéatopathie | - | - | | ± | ± |

Tableau 1b. Algorithme diagnostique des stéatopathies non alcooliques (FLIP)-EASL : SAF score

| Steatose → | Ballonisation → | Inflammation lobulaire → | diagnostic |
|------------|-----------------|--------------------------|-------------|
| 1,2,3 → | 0 → | 0 → | NAFL |
| | | 1 → | NAFL |
| | | 2 → | NAFL |
| 1,2,3 → | 1 → | 0 → | NAFL |
| | | 1 → | NASH |
| | | 2 → | NASH |
| 1,2,3 → | 2 → | 0 → | NAFL |
| | | 1 → | NASH |
| | | 2 → | NASH |

NASH : Non-alcoholic Steatohepatitis; NAFL: Non Alcoholic Fatty Liver

Scores histologiques des stéatopathies métaboliques

Les scores histologiques ont été établis pour évaluer l'activité et la sévérité de la stéatopathie métabolique. Ils évaluent avec une méthodologie reproductible et de manière quantitative l'évolution des différentes composantes histologiques de la pathologie. L'impact spécifique d'un traitement peut ainsi être mesuré et précisé.

Une des premières classifications est établit par *Brunt E. et al*, et concerne la NASH (9). Cette classification comprend deux échelles, l'une évaluant l'activité nécrotico-inflammatoire et la seconde la fibrose. L'activité inflammatoire histologique, quantifiée en trois stades de léger à sévère, est corrélée à la sévérité de la cytolyse et à l'intensité de l'insulino-résistance. La classification proposée par *Brunt et al* ne concernant que les patients atteints de NASH, un nouveau score a été proposé par *Kleiner et al* a été étendue à l'ensemble de la stéatopathie métabolique. Le score de Kleiner ou NAS (Nafld Activity Score) évalue l'activité de chacune des composantes histologiques de la stéatopathie métabolique. Le NAS est un score composite dont la valeur correspond à l'addition de chaque élément le constituant : stéatose, inflammation lobulaire et ballonisation hépatocytaire (ex : 2+0+1 =3). La somme obtenue fournit un résultat entre 0 et 8. Les valeurs du score ont été réparti de 0-3 :

« No NASH » ; 3-5 : « Probable NASH » ; 5-8 : « definite NASH ». Toutefois, la valeur quantitative du score ne se substitue pas au diagnostic établi par l'anatomopathologiste. Néanmoins, sa simplicité d'utilisation a conduit à son mésusage comme outil diagnostique dans de nombreuses études (10,23).

La fibrose et sa quantification sont nettement plus consensuelles. Les stades de fibrose définie en 1999 par *Brunt et al*, ont été réactualisés selon *Kleiner et al* en 2005 sans modification significative. La fibrose de F1 est simplement compartimentée en 3 sous-groupes 1A, 1B et 1C.

Le score SAF (Stéatose Activité inflammatoire et Fibrose) a été développé plus récemment à partir d'une cohorte de 679 patients opérés de chirurgie bariatrique (22), puis étendu et validé prospectivement dans une population à risque de NAFLD (21). L'avantage du SAF est sa simplicité d'utilisation. Il est construit de manière à être représentatif de chaque composant de la pathologie : la stéatose (S), l'activité nécrotico-inflammatoire (A) et la fibrose (F). La prise en compte de manière indépendante de chaque élément permet de suivre intuitivement l'évolution histologique mais aussi de porter le diagnostic de stéatohépatite.

Toutefois, ces scores ont peu de valeurs pronostiques et seule la fibrose est objectivement associée, dans ses stades avancés ($\geq F3$), à une augmentation significative de la morbi-mortalité hépatique. Certains auteurs ont retrouvé une augmentation de ce risque pour des stades moins avancés (8). La fibrose pouvant être estimée grâce à des outils non invasifs, les patients peuvent ainsi être stratifiés en fonction de leur risque sans bénéficier systématiquement d'une biopsie hépatique.

3. Tests non-invasifs et stéatopathie métabolique.

La stéatopathie métabolique est actuellement la cause la plus fréquente de maladie du foie dans le monde (24). Sa forte prévalence, de l'ordre de 20% de la population, restreint l'utilisation de la biopsie. Les complications de la biopsie hépatique, l'offre de soin actuelle, le coût de la biopsie et les risques d'une erreur d'échantillonnage imposent d'utiliser la biopsie diagnostique chez les patients les plus à risque de formes sévères ou avancées de la maladie, et par conséquent à risque de morbidité et mortalité hépatique. Actuellement, l'usage de la biopsie s'intègre dans l'identification de patients candidats à un traitement de la NASH.

Toutefois, le pronostic dépend de la sévérité de la fibrose. Ainsi, les tests non-invasifs sanguins et élastométriques permettent de répartir les patients en fonction de leur risque. Les autres tests estimant la présence d'une stéatose ou d'une NASH sont essentiellement utilisés en recherche épidémiologique ou translationnelle et non dans une pratique clinique quotidienne.

a. Tests non-invasifs de dépistage de la stéatose.

Le risque de mortalité associée à la présence d'une stéatose hépatique n'est pas clairement démontré ou établi. Les études sont contradictoires (25,26). Ainsi le dépistage de la stéatose hépatique à l'échelle d'une population relève (pour l'instant) de la recherche épidémiologique plus que d'une nécessité de la santé publique.

La stéatose se diagnostique aisément en échographie voire à l'IRM, en cas de doute, et sa quantification ne représente pas pour l'instant d'intérêt spécifique (*Recommandations AFEF juillet 2020*). Toutefois, l'applicabilité, à grande échelle, des outils d'imagerie semble compromise. Seuls des tests biologiques ou clinico-biologiques non-invasifs de stéatose

pourraient avoir une application concrète pour l'étude de la prévalence ou de l'incidence de la maladie.

Pour le dépistage, ces tests de stéatose doivent être peu coûteux, simples, fiables, reproductibles, acceptables et validés. Aujourd'hui si les tests de stéatose possèdent des performances intrinsèques relativement intéressantes (sensibilité et spécificité), leurs performances extrinsèques c'est à dire leurs valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) dépendent fortement de la prévalence de la pathologie dans la population étudiée. Malheureusement très peu de tests ont été effectués en population générale (27). Un test biologique ayant été le plus utilisé reste le FLI (Fatty Liver Index) qui a notamment été utilisé pour l'étude de la prévalence de la stéatopathie métabolique à l'échelle de la population française (28). On pourra également citer le steatotest. Ce dernier a été évalué chez les patients diabétiques, obèses morbides ou encore chez les patients porteurs d'une stéatopathie métabolique. Toutefois, ce test n'a pas été validé en « population générale » et son coût limite son usage (29–31).

b. Tests non-invasif de la NASH.

Un test non invasif afin d'identifier un patient à haut risque de NASH a une vraie utilité clinique. Elle permet de sélectionner des patients à risque de progression rapide de fibrose. Plusieurs tests ou outils clinico-biologiques permettent de stratifier ce risque principalement au sein d'une population de patients atteints de stéatose (27). Parmi les plus simples on peut évoquer le dosage des transaminases identifié comme plus élevé dans l'ensemble des études chez les patients porteurs d'une NASH en comparaison à ceux sans NASH (32,33). Toutefois la corrélation avec la stéatohépatite reste faible et influencée par la sévérité de la maladie ou de la fibrose. De plus leur normalité n'exclut pas le diagnostic (34). L'association des transaminases à des éléments cliniques comme le diabète et l'obésité,

augmente alors la probabilité de la NASH (28). D'autres approches ont été étudié notamment la recherche de biomarqueurs en lien avec la physiopathologie de la maladie hépatique comme le CK18, ou des combinaisons de marqueurs biologiques et cliniques associant le plus souvent IMC, présence de diabète, transaminases etc (35,36). Des stratégies plus récentes s'appuient sur les miRNA ayant abouties au test prometteur NIS4 (37). Ce test quantitatif permet de classier le risque de stéatohépatite métabolique. A titre d'exemple, un NIS4 supérieure à 0.63 possède une sensibilité de 50,7%, une spécificité de 87% et une VPP de 79%. Le principal intérêt de ce test repose sur son caractère indépendant des transaminases, de l'IMC, de l'âge et du sexe. Son utilisation, tout comme sa susceptibilité au changement nécessite des validations complémentaires en population à risque voire en population générale.

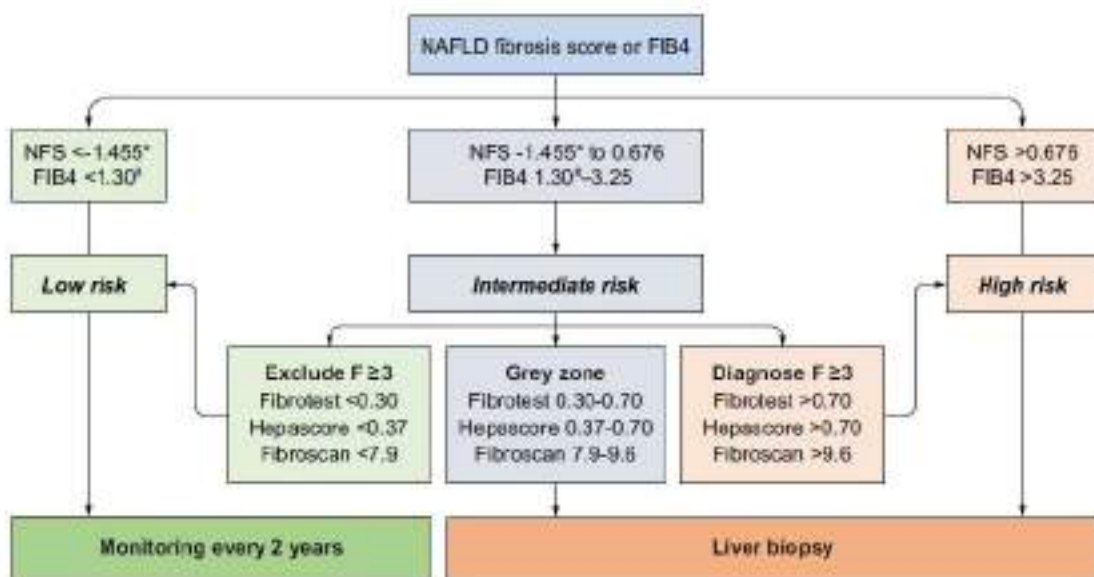
c. Tests non-invasif de fibrose

Ainsi, les sociétés savantes (AASLD & EASL) recommandent le dépistage d'une fibrose avancée au moyen de tests non-invasifs chez les patients souffrant de NAFLD (38,39). Ces tests sont considérés comme acceptables quel que soit le stade de fibrose. La sévérité et le risque de mortalité hépatique devient significatif en cas de fibrose avancée définit par une fibrose en pont, soit \geq F3. Ces risques augmentent avec l'apparition de la cirrhose et de son aggravation.

Quel que soit le test sanguin ou élastométrique, son objectif est d'exclure la présence d'une fibrose avancée chez le patient. Ainsi, un Nafld fibrosis score (NFS) avec une valeur inférieure à -1,455 ou un Fib-4 < 1,30 possèdent une VPN de fibrose avancée supérieure à 90% (41) (*Recommandations AFEF 2020*).

Les taux significatifs de faux positifs sont encore la principale problématique des tests de fibrose dans la prédiction de la fibrose avancée. Ainsi la combinaison de différents scores/tests non invasifs permettent d'affiner les performances diagnostiques. Cette stratégie permet de stratifier les patients en fonction de leur risque de mortalité avec une probabilité d'erreur « acceptable ».

Plusieurs stratégies ont été ainsi proposées par l'EASL (5). Ces stratégies ont récemment été évaluées (figure ci-dessous). L'algorithme comporte deux tests successifs. La première étape consiste en un Fib4 ou un NaflD Fibrosis Fibrosis (NFS). Puis en fonction du test, un second test comprendra un Hepascore, un fibrotest ou un fibroscan. Ces tests permettent alors d'identifier les patients candidats à la biopsie hépatique pour confirmer la fibrose extensive et rechercher un diagnostic de NASH. (cf figure ci-dessous, extraite des recommandations de l'EASL)



Ces stratégies séquentielles ont été évaluée et comparée par *Boursier et al.* Le fibroscan apparaît comme un test plus performant que les tests sanguins. L'association fibrometre/fibroscan (Fibrometre^{VTCE}) apparaît comme prometteuse en qualité de deuxième test avant biopsie (38). La principale problématique reste la validation de ces algorithmes en population a risque telle que les patients diabétiques ou métaboliques.

Epidémiologie de la stéatopathie métabolique

A l'échelle mondiale, la stéatopathie métabolique représente la cause la plus fréquente des maladies hépatiques chroniques (24). A titre d'exemple, ses formes les plus sévères, carcinome hépatocellulaire CHC et cirrhose représentent respectivement la deuxième indication de greffe pour de CHC et la troisième pour insuffisance hépatocellulaire aux USA (40). Cette évolution fait suite aux politiques de traitement et de santé publique ciblant les hépatites virales : vaccination anti-virale B, dépistage, et innovation thérapeutique dans le traitement de l'hépatite C. Toutefois, la prévalence exacte reste difficile à apprécier. Son caractère asymptomatique complexifie son étude épidémiologique. Par ailleurs, les données disponibles varient significativement en fonction de la période étudiée, de la population d'intérêt et des outils diagnostiques utilisés. Ainsi, les grandes études concernent des populations disparates : asiatiques, hispaniques ou caucasiennes. Elles utilisent des biomarqueurs sanguins comme les transaminases ou radiologiques telle que l'échographie abdominale. Leur sensibilité et spécificité sous-optimales questionnent sur les données de prévalence et d'incidence de la maladie. A l'inverse, le contexte métabolique de l'obésité et du diabète, dans lequel se développe la stéatopathie métabolique permet d'estimer les évolutions futures et d'apprécier l'impact de la stéatopathie dans une population.

Implicitement, jusqu'à l'obtention de biomarqueurs diagnostiques fiables, reproductibles, peu onéreux et utilisables pour un dépistage à l'échelle d'une population, l'approche épidémiologique de la stéatohépatite nécessite l'étude de ses facteurs de risque croisée à celles des données de cohorte.

1. Incidence et Prévalence de la stéatopathie métabolique.

a. Incidence

Il existe peu d'études et de données disponibles que ce soit à l'échelle mondiale ou régionale sur l'incidence de la NAFLD, ce qui complexifie son analyse. Ainsi dans sa méta-analyse mondiale sur la NAFLD, *Younossi et al* ne pouvait déterminer précisément l'incidence de la maladie. Cette dernière n'était estimée que dans deux régions : l'Asie et Israël avec des taux extrêmement différents : 52/1000 [28,3-96,7] personnes/année et 28/1000 [19,3-40,6] personnes/année respectivement (3). De nouvelles études asiatiques ont estimé l'incidence autour de 50,9 [44,8-57,4] (41). Aux Etats-Unis, une étude de registre de santé (PMSI/cotation d'acte de soin) en médecine de ville, analysée par la Mayo Clinic met en exergue deux points majeurs : la forte évolution de l'incidence de la stéatopathie métabolique de près de 62/100 000 à 329/100 000 personnes/année entre 1997 et 2014 (42) et surtout un taux très nettement inférieur aux prédictions et modélisation publié par *Younossi et al*. Ces résultats reflètent les difficultés d'étudier l'incidence de la NAFLD.

Un point essentiel converge entre toutes les études. La cinétique d'évolution croissante de la pathologie, surtout sur les 15 à 20 dernières années. L'augmentation de l'incidence concerne l'ensemble des classes d'âge, mais l'évolution la plus marquée reste celle des moins de 40 ans (+700%, vs +400 chez les plus de 60 ans)(42).

b. Prévalence

A l'échelle mondiale, la prévalence de la stéatopathie métabolique estimée par les méta-analyses est de l'ordre de 25,4% (IC 95% : 22,1-28,7). Les plus fortes prévalences, avoisinant les 30% de la population et sont retrouvées au Moyen-Orient et en Amérique du

Sud. La plus faible prévalence concerne l’Afrique 13,5 (IC 95% : 5,7-28,7) (3). Toutefois, les données africaines sont marginales, rarement validées ou reconfirmées et ne concernent que quelques pays comme l’Afrique du Sud. La généralisation à l’échelle continentale, avec ses très grandes variations ethniques et socio-démographiques impose la plus grande prudence. On peut toutefois estimer la prévalence mondiale entre 10 et 25%. Ces données épidémiologiques requièrent des études nationales ou locales confirmatoires. Ainsi, en France, à partir de l’analyse de la cohorte CONSTANCE, dont les caractéristiques démographiques et socio-économiques sont représentatives de la population française, la prévalence de la NAFLD est estimée à 18% (estimée sur l’analyse du FLI score). La prédiction de la fibrose avancée au sein de cette population de patients NAFLD avoisine les 2.5%. Numériquement, la NAFLD concernerait près de 9 millions de Français dont environ 225 000 avec une fibrose avancée (28).

A l’évidence, la prévalence augmente au sein de groupes à risque : patients obèses, diabétiques, ou atteint de syndrome métabolique (43). La causalité ou l’ordre de survenue entre stéatose et facteur de risque cardiovasculaire (FDR CV) reste flou. Ainsi, *Ma J et al* ont mené une étude bi-directionnelle des risques de développement d’une stéatopathie métabolique en cas de présence de FDR CV ou à l’inverse de développer des FDR CV en cas de présence de NAFLD. L’étude ne permet pas d’identifier la stéatopathie métabolique comme un facteur causal ou précédent la genèse du syndrome métabolique. Néanmoins, sur une durée de suivi médiane de 6 ans, les risques sont à significativement augmenté de développer une HTA, un diabète en cas de NAFLD et réciproquement (44).

c. Projection de la NAFLD et de son impact sur la santé publique

L’ensemble des projections et des modélisations évolutives de la NAFLD au cours des prochaines décennies soulignent l’augmentation du nombre de cirrhose et de CHC. Une des

modélisations les plus récentes estiment que la NAFLD toucherait près de 100 millions d'américains d'ici 2030, soit une augmentation de plus de 20% du nombre de patients, atteignant ainsi près d'un tiers de la population adultes des USA. En 2030, les conséquences seraient de l'ordre de 3 millions de patients atteints de cirrhose et environ de 25 000 CHC soient plus de 150% d'augmentation comparativement à 2015 (45).

Ces chiffres bien que nécessitant une confirmation par d'autres équipes impliquent d'évaluer l'impact de politique de santé publique sur l'évolution de la maladie en cas de réductions de facteurs de risque de la pathologie tels que l'obésité et le diabète. L'augmentation des stratégies de dépistage et d'identifications des patients à risque d'évènements hépatiques et carcinologiques sont indispensables afin de juguler et prendre en charge l'afflux significatif de patients atteints de cirrhose ou de CHC. La gestion est d'autant plus difficile que les stratégies de dépistage du CHC chez les patients sans cirrhose ne sont pas établies, alors la fibrose n'est que rarement avancée ou sévère chez les patients ayant un CHC sur foie stéatosique (46).

2. Facteurs de risque de la stéatopathie métabolique.

a. L'âge

L'âge reste le facteur de risque le plus solide en raison des liens entre maladie et durée d'exposition au risque. Ainsi, la prévalence estimée augmente avec l'âge : 22,4% (IC : 15,4-31,5) pour les 30-40 ans vs. 28,9% (IC : 19,3-40,9) chez 60-70ans (3). Cependant, l'impact de l'âge doit être nuancé chez les patients de plus de 80 ans. La prévalence chute en raison de la mortalité compétitive cardiovasculaire. Ainsi, la prévalence diminue à environ 20 % dans les populations gériatriques (47).

b. Predisposition et facteurs génétiques

L'analyse des polymorphismes génétiques grâce aux études d'association pangénomiques (GWAS, Genome Wide Association Studies) ont identifié plusieurs gènes dont le polymorphisme augmente le risque de stéatopathie : *PNPLA3* (*patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*), *MBOAT7-TMC4* (*membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7 et transmembrane channel-like 4*) et *TM6SF2* (*Transmembrane 6 superfamily 2 human*).

PNPLA3 a été le premier décrit. Son polymorphisme allélique (rs738409; I148M) à l'état homozygote est associée à la stéatopathie métabolique quel que soit sa forme: stéatose, NASH ou cirrhose (48). Ce polymorphisme est significativement plus à risque chez les ethnies hispano-américaines. Le polymorphisme (I148M) homozygote prédispose à la stéatopathie indépendamment de l'insulinorésistance et de l'indice de masse corporelle. *PNPLA3* possède une activité enzymatique avec une activité d'hydrolase des TAG, se rapprochant des lipases (49,50) mais son rôle fonctionnel reste que partiellement compris. Cependant, les données les plus robustes démontrent que la *PNPLA3* est impliquée dans le remodelage des triglycérides contenus dans les vacuoles lipidiques intra-hépatiques. Toutefois, le variant I148 n'influence ni la synthèse, ni l'utilisation, ni l'excrétion hépatique des triglycérides. A l'inverse, le variant 148M perturbe l'ubiquitination et par conséquent la dégradation protéasomale. Ce polymorphisme provoque l'accumulation de *PNPLA3*-148M et altère les flux de mobilisation/recrutement des triglycérides dans les vacuoles lipidiques (51). Ainsi, les mécanismes physiopathologiques semblent plus vraisemblablement impliqués dans l'accumulation lipidique et facilitant la stéatose, qu'avec les mécanismes inflammatoires ou de stress cellulaire de la NASH. En ayant un risque accru de développement de la maladie, la population de patients I148M homozygotes possède une forte prévalence de stéatopathie et donc de formes sévères (NASH, cirrhose, CHC). Jusqu'à ce jour, aucun lien mécanistique

physiopathologique entre PNPLA3 et les phénomènes de transition stéatose/NASH n'a été décrit.

Le polymorphisme rs641738 et son variant C>T contenu dans le locus de MBOAT7-TMC4 engendre un surrisque d'environ de 20% de stéatopathie métabolique. L'atteinte hépatique présente une inflammation tissulaire et une fibrose plus marquée (52). MBOAT7 encode pour une enzyme la LPIAT1 (lysophosphatidylinositol acyltransferase 1). LPIAT1 transfère l'acide arachidonique depuis l'arachidonyl-Coa au lysophosphatidylinositol (53) et régule ainsi le métabolisme de l'acide arachidonique via le remodelage des phospholipides. Les enzymes LOX (lipo-oxygénase) et COX (cyclo-oxygénase) métabolisent l'acide arachidonique en lipides eicosanoïques pro-inflammatoires comme les prostaglandines ou les leucotriènes (54). Le polymorphisme rs641738 induit une substitution p.Gly17Glu dans TMC4. Ce polymorphisme est responsable d'une diminution de l'expression MBOAT7 (52), provoquant l'accumulation de métabolites lipidiques pro-inflammatoires.

Le polymorphisme E167K de TM6SF2 a été démontré comme étant corrélé avec les taux de cholestérol sanguin (cholestérol total et LDLc), le risque d'infarctus et la stéatopathie métabolique (55). Le polymorphisme E167K est associé à une perte de fonction de TM6SF2. Les effets rapportés par les études mécanistiques ciblent deux mécanismes potentiels. Le premier serait en lien avec une diminution de la synthèse des triglycérides entraînant une augmentation de la β -oxydation des acides gras responsable d'une accumulation de radicaux libres toxiques (56). L'autre mécanisme évoqué serait le lien entre TM6SF2 et le métabolisme du cholestérol via le *Cyp2c54* dont l'expression est influencée par le polymorphisme (diminution d'expression avec le polymorphisme E167K) et une réduction du récepteur CD63 qui se lie au LDL. La conséquence serait une accumulation intra-hépatique de cholestérol et de ses dérivés (57).

c. Diabète de type 2

La stéatopathie métabolique et sa sévérité sont significativement liées à l'insulinorésistance et à son intensité. En conséquence, les interconnexions physiopathologiques entre le diabète de type 2 et la stéatopathie métabolique sont responsables d'une forte prévalence épidémiologique de la stéatopathie métabolique chez les sujets diabétiques. Une méta-analyse sur une vingtaine d'articles, retrouvent un risque de développement de diabète multiplié par 2 en cas de stéatose échographique, mais aussi en cas de perturbation du bilan hépatique (ALT ou GGT) (58). Une autre étude récente sur près de 50 000 patients diabétiques décrit une prévalence globale de la NAFLD de 55.5% (IC 95% : 47,3-63,7). La prévalence estimée est plus importante en Europe 68.0% (IC 95% : 62.1-73.0%), probablement en lien avec des biais diagnostiques. De même, la prévalence des formes sévères est importante avec près de 17% (95% CI 7.2-34.8) de fibrose avancée et 37% de NASH (95% CI 24.7-50.0%) (59).

L'augmentation synchrone de la prévalence de la stéatopathie métabolique à celle du diabète de type 2 aux USA souligne le lien physiopathologique et la relation étroite de ces deux pathologies. Ainsi le diabète de type 2 a doublé de 7 à 14% sur les 30 dernières années, quand la prévalence de la stéatopathie métabolique a augmenté de 20 à 32% (41).

Comme soulignées par les recommandations de l'EASL et de l'AASLD, la population de diabétique de type 2 en fait une cible de prioritaire pour le dépistage de la NASH et de la fibrose avancée (5). De même que le diabète doit être dépisté régulièrement chez les patients atteints de stéatopathie métabolique.

d. Obésité.

L'obésité se définit comme un excès de masse grasse responsable du développement de complications néfastes pour la santé. L'OMS la reconnaît comme une maladie depuis 1997 dont la propagation mondiale l'élève au rang de pandémie (60). Les données

épidémiologiques internationales et notamment aux USA sont alarmantes et suggèrent qu'elle soit responsable d'une diminution de l'espérance de vie (61). Des programmes internationaux soutenu par l'OMS ont ainsi vu le jour pour surveiller à l'échelle planétaire l'évolution pondérale des populations (62–64).

En pratique courante, l'indice de masse corporel (IMC) définit l'obésité lorsque qu'il est supérieur ou égale à 30 kg/m². Néanmoins, cet indice est imparfait, car il ne prend pas en compte la masse grasse dans sa définition. Les femmes enceintes ou les sportifs de haut-niveaux seront diagnostiqués comme obèses selon l'application de cette définition. Un autre inconvénient de l'IMC est qu'il ne permet pas de déterminer la répartition de la masse grasse. En effet, c'est surtout cette dernière qui prédit le mieux le risque de complication métabolique. Ainsi, l'augmentation du tour de taille définit l'obésité androïde témoin d'un excès de masse grasse abdominale en opposition à l'augmentation du tour de hanche qui correspond à l'obésité gynoïde. L'obésité androïde est associée au risque d'insulino-résistance et appartient à la définition du syndrome métabolique. Elle est fortement associée à la NAFLD.

Toutefois cette définition est simple d'utilisation, reproductible et permet d'estimer les risques en lien avec la maladie. L'IMC classe les stades de surpoids et d'obésité selon des seuils (présenté dans le tableau ci-dessous) ou grade. Le risque de mortalité augmente avec l'IMC (65). Chaque grade au-delà de 25 augmente le risque de mortalité toute cause confondue. Ainsi, le HR (Hazard Ratio) de la mortalité pour une obésité de grade 1 est de 1,45 (IC 95% : 1,41–1,48); HR pour une obésité de grade 2 de 1,94 (IC 95% : 1,87–2,01) et pour une obésité de grade 3 de 2,76 (IC 95% : 2,60–2,92) (66).

| Indice de masse corporelle | Classification |
|--|--------------------------------------|
| 25 - 30 kg/m² | Surpoids |
| 30 - 35 kg/m² | Obésité modérée (obésité de grade 1) |
| 35 - 40 kg/m² | Obésité sévère (obésité de grade 2) |
| Supérieur à 40 kg/m² | Obésité morbide (obésité de grade 3) |

A l'échelle mondiale, près de 35% de la population mondiale est en surpoids ou obèse. En France, 54 % des hommes et 44 % des femmes sont en surpoids ou obèses. La prévalence de l'obésité sans distinction du sexe est de l'ordre de 16 à 17%. De même que pour le surpoids, elle augmente avec l'âge (*Données étude ESTEBAN 2014-2016, santé publique France, données publiques en ligne*). Les catégories socio-professionnelles défavorisée souffrent plus fréquemment de surpoids ou d'obésité, que ce soit en France ou aux USA. Le ratio homme/femme diffère en fonction de l'origine géographique. Les femmes sont plus fréquemment touchées dans les pays en développement, alors qu'il s'agit plus généralement des hommes dans les pays développés (65,67).

Les données épidémiologiques rapportent une phase d'augmentation continue de l'IMC moyen au sein des populations infantiles et adultes entre 1980-1990 et 2008. En France, la prévalence de l'obésité a triplé en 30 ans. En 1981, elle était de 5,3%, alors qu'elle est aujourd'hui autour de 16%. L'augmentation annuelle de l'obésité survient au milieu des années 1990 (8% par an) et reste soutenue jusqu'en 2009 (données Obépi-Roche). Néanmoins, de nombreuses données notamment aux USA suggèrent un effet de ralentissement voire de stabilisation de ces tendances depuis les dix dernières années (68–70). Il en est de même en France où la dernière étude ESTEBAN 2014-2016 rapporte également une relativement stabilité sur les dernières années.

L'obésité est un facteur de risque majeur de stéatopathie et de NASH. Ainsi, la prévalence estimée de l'obésité parmi les patients porteurs d'une stéatopathie est de l'ordre de 51% et de 83% pour ceux atteints de NASH. A l'inverse, 60% des patients en surpoids et 90-95% des patients obèses sont atteints de stéatopathie (3). On peut toutefois discuter de ces chiffres très élevés. Les données chez les obèses morbides provenant des études de chirurgie bariatrique sont nombreuses. Ces dernières sont par définition biaisées par le profil des candidats à la chirurgie : forte prévalence de femme, IMC entre 45-50, taux de diabète généralement avoisinant les 30%, ou encore l'âge jeune 45-50 ans. Toutefois, le recours à l'évaluation histologique systématique esquisse un tableau plus fin de la prévalence de la Nafld chez les sujets obèses morbides. Ainsi, la cohorte du CHU de Lille, qui suit prospectivement les patients opérés de chirurgie bariatrique depuis 1994 retrouve une prévalence de 82% de stéatose dans cette population d'obèse morbide. Chez les moins de 35 ans, la prévalence diminue à 72% (IC 95% 68,3-74,9) et 92% (IC 95% : 88,2-94,4) chez les plus de 55 ans. Ces données sont présentées dans le tableau ci-dessous (*données extraites de la « lille bariatric cohort » publiée en 2006, 2009 et 2015*).

| Population de la cohorte | Prévalence de la stéatose |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Totale | 82,1 % (N= 2421, IC 95% : 80,6-83,6) |
| Age < 45 ans (N, IC 95%) | 71.7% (N=759, IC 95% : 68.3-74.9) |
| Age : 35-45 | 81,8 % (N=665, IC 95% : 78.7-84.7) |
| Age 45-55 | 89,7% (N= 658, IC 95% : 87,3-91,9) |
| Age > 55 ans | 91,7% (N=339, IC 95% : 88,2-94,4) |

Données non publiée, extraite de la base de données « Lille bariatric Cohort »

Partie 2 : Histoire naturelle de la stéatopathie métabolique

Histoire Naturelle de la stéatopathie métabolique

L'histoire naturelle de la stéatopathie métabolique s'inscrit dans celle des hépatopathies, mais également à celle du syndrome métabolique. Ainsi, les probabilités d'événements hépatiques ou vasculaires diffèrent en fonction de la nature et la sévérité de l'atteinte histologique hépatique.

L'histoire hépatique de la stéatopathie métabolique initialement décrite par *Matteoni et al* (71), puis précisée par d'autres auteurs comme *Angulo et al*, *Eksted et al* (7,8,72), révèle le lien étroit entre inflammation (steatohépatite) et progression vers la fibrose puis la cirrhose mais aussi la forte association entre fibrose et mortalité hépatique. Le champ lésionnel histologique s'étend de la stéatose simple, faiblement évolutive et très peu associée à la mortalité hépatique, à des formes évolutives telle que la steatohépatite qui conduit à la fibrose avancée et la cirrhose.

Toutefois, l'histoire naturelle de la stéatopathie métabolique s'intègre dans celle du syndrome métabolique et du risque cardiovasculaire. De nombreuses publications rapportent une plus grande prévalence des événements ischémiques et cardiovasculaires chez les patients NAFLD qu'ils soient diabétiques ou non (73,74). Toutefois, la preuve de l'imputabilité de la NAFLD dans ce surrisque reste encore imparfaite. La plupart des études sur la mortalité de la stéatopathie métabolique ont été réalisées dans des cohortes de patients obèses/métaboliques, et par conséquent à haut risque vasculaires. L'influence de la NAFLD indépendamment de la présence d'un syndrome métabolique et/ou de l'obésité doit être précisé. En effet, certains résultats d'études épidémiologiques récentes ne retrouvent pas de surrisque après ajustement sur de multiples paramètres (âge, l'IMC, le diabète, le tabagisme etc) (75). *Allen et al* décrit

un surrisque d'évènements vasculaires en cas de présence d'une NAFLD indépendamment du syndrome métabolique. Toutefois, l'impact de la stéatopathie sur la mortalité et les évènements vasculaires diminue à mesure que le nombre de facteurs de risque métaboliques augmente (42). Toutefois, le retentissement de facteurs de risques individuels tels que les antécédents familiaux cardiovasculaire ou de cirrhose, le statut génétique PNPLA3 ou même l'évolution pondérale des patients sont susceptibles d'influencer la morbi-mortalité.

1. Facteur de risque de mortalité de la stéatopathie métabolique

La principale problématique dans l'analyse des risques de mortalité des patients avec une stéatopathie métabolique réside dans les variations des définitions utilisées dans les études de cohorte. A titre, d'exemple, la cohorte NHAMES III étudiant l'obésité et ses facteurs de risques aux USA définit la maladie soit par des perturbations du bilan hépatique (augmentation des transaminases, sans autre cause étiologie évidente), soit par la présence d'une stéatose échographique. Ces cohortes permettent d'obtenir des données macroscopiquement recevables, mais avec de nombreux biais dont les données déclaratives sur la consommation d'alcool (76,77). Toutefois, la taille des populations étudiées constitue le principal avantage. Ces cohortes soulignent les trois principaux risques de mortalité de la NAFLD : carcinologique, cardiovasculaire, et hépatique (6).

2. Mortalité hépatique et histologie hépatique

L'étude princeps sur l'histoire naturelle de la NAFLD, a été effectué par *Matteoni et al* (71). Tous les patients étaient biopsiés, le suivi médian était de l'ordre de 8 ans. La définition et la classification utilisées diffèrent de celle utilisée actuellement. Les auteurs ont ainsi, subdivisée leur cohorte en 4 groupes histologiques. Le groupe 1 était celui de la stéatose

simple ; le groupe 2 celui de la stéatose associée à l'inflammation lobulaire ; le groupe 3, stéatose avec ballonnisation hépatocytaire et le groupe 4 à ceux correspondant le plus au profil de la stéatohépatite avec ballonnisation, des corps de Mallory ou fibrose. Les risques de mortalités ne différaient pas entre les groupes 1-2 et 3-4. Toutefois, le risque de développer une cirrhose était significativement plus important dans les groupes 3-4 que 1-2 (25% vs 3%). Historiquement, on estime que près de 10 à 25 % des patients porteurs d'une NASH évolueront vers la cirrhose sur une médiane de 20 ans (78). Une analyse avec une classification plus récente de la stéatopathie métabolique a été effectuée par *Angulo et al* (8). Au sein d'une cohorte de 619 patients diagnostiqués de 1975 à 2015. Le temps médian de suivi était de 12.6 années. Dans cette étude, le principal facteur de risque de mortalité était la présence d'une fibrose quelque soit sa sévérité. Le risque de mortalité augmentait avec la sévérité de la fibrose de 1.9 à 10.9. Parallèlement à la fibrose, le diabète et le tabagisme étaient associés à une surmortalité alors que la présence d'un traitement à base de statine en réduisait le risque.

La mortalité était associée à la sévérité de la fibrose et non pas à la présence d'une stéatohépatite. Toutefois, la présence d'une inflammation hépatique chronique induit la fibrogenèse et la fibrose. La fibrose apparaît comme un marqueur de sévérité et un excellent critère pour définir l'efficacité d'un traitement. Toutefois, exclure la NASH pour ne se concentrer que sur la fibrose, n'apparaît pas logique à l'échelle physiopathologique. En effet, de nombreuses études démontrent que la NASH est le principal facteur de risque d'évolution de la fibrose et de la cirrhose (72).

Il est possible de relier l'histologie et sa sémiologie au pronostic, en sus de la présence d'une NASH. Ainsi, la ballonnisation hépatocytaire et de l'inflammation portale apparaissent significativement associée au risque de NASH et de progression de la fibrose (8). De manière

étonnante, l'inflammation lobulaire inclus dans la classification de Kleiner & Brunt et utilisée par le NASH-CRN n'était pas associée au risque d'évènements.

3. Evolution de la stéatose simple

Depuis de nombreuses années, la stéatose est reconnue comme étant à un faible risque d'évolution vers la cirrhose et par conséquent de mortalité hépatique (79). Toutefois, si le risque de la stéatose en absence de fibrose à un temps donné reste négligeable d'un point de vue hépatique, il existe un risque d'évolution vers la NASH qui n'est pas négligeable (80–82). Ce risque incite à un suivi. Néanmoins, les taux de transformation de la stéatose en NASH dans la littérature sont relativement conséquents. Toutefois, l'analyse de ces études révèle une activité biologique intense à baseline, avec des transaminases entre 3 et 5N. On peut supposer qu'il s'agisse d'un biais de cette sélection favorisée par le recrutement dans un centre de soin tertiaire (CHU). Des études en population dite « générale » ou de suivi en ville devront être effectuées afin de déterminer si ces taux d'évolution vers la NASH sont aussi significatifs ou s'ils ne sont pas plus représentatifs de population à haut risque comme les sujets diabétiques, obèses avec des transaminases élevées.

4. Evolution de la NASH

La NASH, responsable d'inflammation hépatique chronique, entraîne une progression de la fibrose. De manière générale cette dernière est considérée comme d'évolution lente avec une progression de fibrose annuelle de l'ordre de 0.15 points. Si l'évolution de la fibrose obéissait à une fonction affine, alors la progression d'un stade de fibrose prendrait en moyenne 7 ans. C'est-à-dire qu'il faudrait près d'une trentaine d'années à la constitution d'une cirrhose (83). Toutefois, cette évaluation approximative ne prend en compte les formes

plus agressives. L'âge et la présence d'une inflammation marquée sur la biopsie sont soulignées comme plus associée à la progression (84). Le diabète, l'obésité ont été avancés comme plus fréquemment présent chez les sujets à risque de progression rapide. Non retrouvé en analyse multi-variée par *Argo et al*, il reste des facteurs de risque de NASH et ont été identifiés par certains auteurs comme a risque de progression (85).

5. Cirrhose

L'étiologie semble influencer de manière relative le risque de mortalité en cas de cirrhose. Les études sont contradictoires et il n'existe pas de méta-analyse permettant de répondre à cette question. Néanmoins, l'analyse des risques d'évènement hépatiques dans la comparaisons entre la cirrhose NASH et virale C sont globalement voisin dans une première étude cas témoin de 23 patients (86). Par la suite, d'autres études ont affinée ces premiers résultats en soulignant un risque moindre de cirrhose décompensée et de CHC en cas de cirrhose NASH comparativement au VHC (87,88). Toutefois, les différences restant faibles, elles n'imposent pas d'adapter le suivi ou les modalités de dépistage en fonction de l'étiologie.

6. Carcinome hépatocellulaire

La stéatopathie métabolique devient progressivement depuis l'avènement des traitements antiviraux directs une des causes les plus fréquentes de CHC (89,90). Aux USA, l'incidence du CHC augmente de manière continue. Elle est de l'ordre de 6,7/100 000 hab/an. La stéatopathie métabolique constitue l'indication pour laquelle l'incidence du CHC possède la plus forte croissance. Ainsi depuis maintenant 5 ans, le CHC développé sur foie métabolique est devenue la seconde cause de transplantation aux USA (40,91). La problématique principale du CHC dans le contexte de la stéatopathie métabolique réside dans

le risque de développement du cancer en dehors de la présence d'une cirrhose. Il semble que près de 30 à 50% des CHC apparaissent sans cirrhose (92), ce qui limite la mise en œuvre de stratégie de dépistage, alors que ces patients sont porteurs de facteurs de risque de CHC indépendamment de la cirrhose tel que le diabète, l'obésité, la prise de poids à l'âge adulte et l'augmentation de la graisse abdominale (93,94). En dehors de la cirrhose, aucune stratégie de dépistage parmi ces patients à risque n'est actuellement recommandée.

L'analyse du parenchyme hépatique des patients non cirrhotiques suivi pour un CHC retrouve une fibrose avancée que dans 20% des cas et près de 50 à 65% d'entre eux n'ont pas de fibrose (46). Il est aussi possible que l'histoire naturelle diffèrent entre les deux entités CHC sur foie de cirrhose et sans cirrhose. La principale hypothèse pour les CHC sur foie non cirrhotique évoque la dégénérescence d'adénomes sur foie de stéatopathie métabolique. En effet, la stéatose et l'obésité apparaissent comme des facteurs de risque d'adénomes. Quelques données semblent soutenir cette hypothèse, nécessitant confirmation (95,96).

Partie 3 : Physiopathologie

Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH : lien étroit entre NAFLD et l'insulinorésistance.

L'alimentation fournit l'apport énergétique calorique nécessaire au fonctionnement de la machinerie cellulaire. Toutefois, l'organisme doit s'adapter aux apports caloriques, à leur fréquence, à leur composition et à leur quantité. Ainsi la physiologie s'ajuste à ses changements et modifie son fonctionnement alternant les phases cataboliques du jeun à la phase anabolique postprandiale.

Les profonds bouleversements du mode de vie occidental ont amélioré l'espérance de vie et diminué de la pauvreté, mais aussi provoqués une augmentation des apports caloriques quotidiens en favorisant un habitus de sédentarisation. En conséquence, l'organisme est soumis à une opulence énergétique, associée à une alimentation fortement enrichie en carbohydate.

Cette abondance conduit à une altération des mécanismes physiologiques du stockage énergétiques des carbohydrates (ou « sucres ») sous le contrôle hormonal de l'insuline. La composition corporelle et notamment les rapports et répartitions des masses grasses et maigres en sont modifiés. L'hypertrophie des tissus de stockage lipidiques, ou tissu adipeux, provoque un déséquilibre hormonal des adipokines, altère la physiologie du stockage énergétique conduisant au syndrome d'insulinorésistance.

L'insulinorésistance est la traduction endocrinienne de la surcharge grasseuse viscérale, correspondant à l'obésité, plus spécifiquement androïde. Elle est au centre de complications métaboliques et cardiovasculaires. L'IR est considéré comme le principal facteur causal du diabète de type 2 (97). La stéatose métabolique se place au cœur de cette

problématique. A ce jour, les traitements les plus efficaces de la NASH sont ceux ayant permis l'optimisation pondérale et la diminution de l'insulinorésistance.

L'insulinorésistance semble être à la croisée des chemins de la physiopathologie et des axes thérapeutiques. Ainsi elle sera détaillée préférentiellement aux autres hypothèses physiopathologiques de la NASH telle que la lipotoxicité ou l'inflammation hépatique.

1. Rappel physiologique : mécanisme d'action de l'insuline.

L'insuline est une hormone peptidique plasmatique ciblant des récepteurs membranaires pour engendrer la réponse anabolique systémique de l'organisme après l'ingestion de nutriment. L'insuline est par essence l'hormone de l'anabolisme. L'insuline cible préférentiellement le muscle, le foie et le tissu adipeux et y possèdent une action spécifique. Ainsi, dans le muscle, l'insuline favorise l'utilisation et le stockage du sucre en promouvant son transport et la glycogénèse. Dans le foie, l'insuline active la glycogénèse et la lipogénèse et réduit la néoglucogénèse. Dans l'adipocyte, elle favorise l'assimilation et le transport du glucose, induit la lipogénèse et inhibe la lipolyse.

Les rouages de la machinerie cellulaire de l'insuline sont initialement similaires dans les trois tissus (foie, muscle, tissu adipeux). Les différences surviennent à la fin de la cascade de transduction du signal. Les récepteurs à l'insuline (INSR : insuline receptor) sont hétérotétramériques, comprenant deux sous-unités α liant l'insuline à l'extérieure de la cellule et deux unités β intracellulaires avec chacune un domaine tyrosine kinase (98). Ces domaines viennent phosphoryler les IRS (insulin receptor substrats) dont ils existent 6 membres, les principaux étant IRS-1 et IRS-2. Une fois activé, ces IRS déclenchent une cascade de phosphorylation intracellulaire des voies : PI3K-AKT, GRB2, SHC ou encore de mTORC1. Il

existe de signaux de rétrocontrôle, notamment NOX4 régulant le signant de phosphorylation et CEACAM1, récepteur membranaire qui provoque l'internalisation du INSR (99,100).

Il existe toutefois des effets métaboliques relativement spécifiques entre chacun des tissus : hépatique, musculaire et adipeux.

a. Mécanismes d'action de l'insuline dans le muscle squelettique.

Le tissu musculaire squelettique est un très grand consommateur d'énergie calorifique. Ainsi, l'absorption glucidique est dévolue au stockage sous forme de glycogène pour une utilisation rapide. Les produits de dégradation énergétiques musculaire provenant de la glycolyse sont le lactate et l'alanine, qui seront recyclés à nouveau en composé énergétique par le foie.

En conséquence, le myocyte doit être en mesure de capter et transporter rapidement le glucose dans son cytoplasme. La cascade de phosphorylation induite par la liaison de l'insuline à son récepteur (avec une action principalement dépendante de l'unité IRS-1), impliquant les kinases PI3K et AKT (101), augmente la translocation du transporteur du glucose, GLUT-4, à la membrane du myocyte (102).

Le glucose internalisé dans le cytoplasme du myocyte grâce à GLUT-4 sera ainsi rapidement phosphorylé par la glucokinase/hexokinase (formation du Glucose-6-Phosphate [G6P]) puis transformé pour sa conservation sous forme de glycogène (ce qui correspond à 75% de l'utilisation métabolique du glucose par le myocyte). Par ailleurs, l'insuline favorise la transcription de l'hexokinase (102,103).

Schématiquement dans le myocyte, l'action de l'insuline favorise l'absorption du glucose et sa phosphorylation grâce à son action combinée sur GLUT-4 et l'hexokinase.

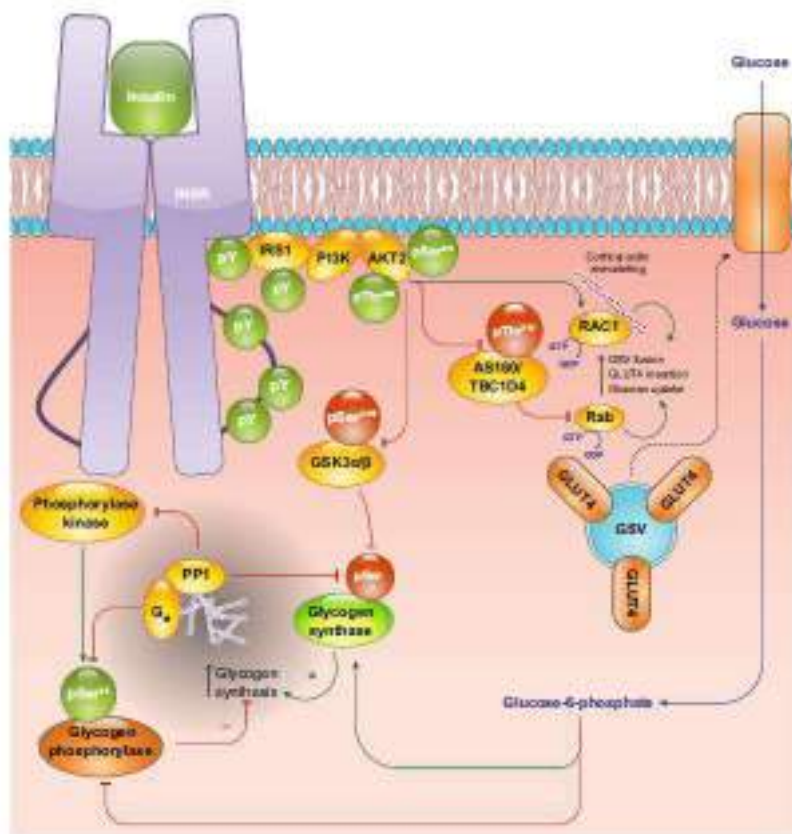


Illustration d'après Petersen et al (104)

b. Mécanismes d'action de l'insuline dans le foie.

Le foie est par essence l'organe du métabolisme permettant l'homéostasie glucidique nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Son action métabolique permet d'alterner de jeun et post-prandiale. Le rôle de l'insuline dans le foie sera de faciliter et provoquer la synthèse de toutes les grandes macromolécules du métabolisme affectées au stockage énergétique : glycogène, triglycéride et protéines. Simultanément, l'insuline déplace le métabolisme d'une phase catabolique vers une phase anabolique et inhibe la synthèse de glucose (néoglucogénèse hépatique). Par conséquent, la quantité d'insuline nécessaire à l'inhibition de la néoglucogénèse hépatique est considérée comme une mesure de l'insulinosensibilité hépatique et par extension de l'insulinorésistance. Ces mesures sont

obtenues grâce aux score HOMA-IR et QUICK-I (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) largement utilisés dans les études de clinique (105).

Au décours d'un repas, la concentration d'insuline dans veine porte augmente (jusqu'à 3 fois les valeurs d'insuline circulante) (105) et provoque l'activation des propriétés de phosphorylation de son récepteur kinase. Cette cascade active successivement PI3K, PDK-1, puis mTORC2 conduisant à la phosphorylation d'AKT (106). Une fois activé AKT possède une double action : l'inhibition de la néoglucogénèse grâce à la phosphorylation et l'exclusion nucléaire de FOXO1 et l'activation de glycogénogénèse en favorisant l'action enzymatique de la glycogène synthase (107). Il existe aussi des mécanismes de régulations indirects de la néoglucogénèse via l'inhibition de la lipolyse du tissu adipeux. L'inhibition de la lipolyse, réduit la quantité de glycérol acheminé au foie restreignant sa contribution à la néoglucogénèse. De même, la diminution d'apports des acides gras au foie, réduit la quantité d'acétyl-CoA mitochondrial impliquée dans l'activation allostérique de la pyruvate carboxylase, permettant la transformation du pyruvate dans le cycle de néoformation du glucose hépatique.

L'insuline régule le métabolisme lipidique hépatocytaire, en majoration la clairance lipidique plasmatique provenant des chylomicrons et des triglycérides reliés aux LDL et en réduisant leur export du foie vers la circulation sous forme de VLDL. L'action anabolique de l'insuline ne déroge au métabolisme lipidique. Ainsi, elle active la lipogenèse de novo intra hépatique sous l'action d'une enzyme clé, cible de cette régulation, la SREBP1c (108). L'insuline agit sur elle de différentes manières. Elle augmente sa transcription via son action sur son récepteur nucléaire. Parallèlement, sa transcription augmente grâce à l'activation de mTORC1 générée par la cascade de phosphorylation intra-hépatocytaire de l'INRS (104). La lipogenèse n'est pas exclusivement contrôlée par l'insuline mais est aussi régulé par la

présence de substrat monosaccharidique entrainant l'expression transcriptionnelle d'autres enzymes telle que la ChREBP ou la Liver X Receptor (LXR).

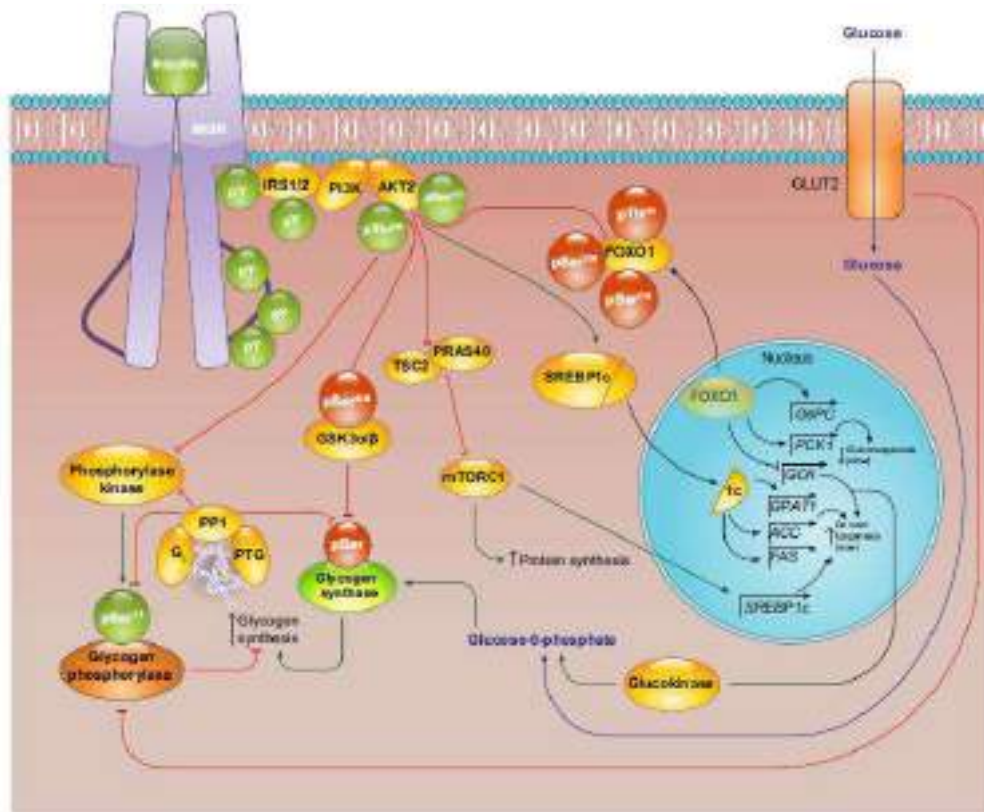


Illustration d'après Petersen et al : action hépatique de l'insuline (104)

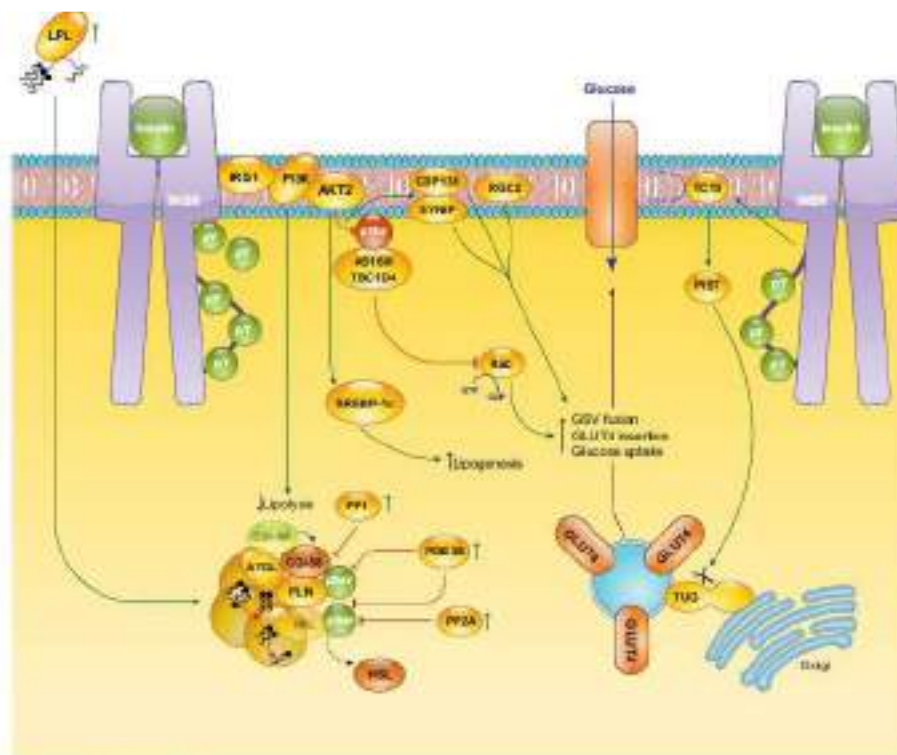
c. Mécanismes d'action de l'insuline dans le tissu adipeux (graisse blanche).

L'inhibition de la lipolyse constitue l'action principale de l'insuline dans le tissu adipeux (109). Etape majeure dans la régulation glycémique, l'inhibition rapide de la lyse des triglycérides du tissu adipeux diminue le contingent d'acides gras non estérifiés circulants. Ce signal inhibiteur agit via la régulation du couple AMPc/PKA, menant au contrôle des protéines régulatrices de lipolyse et de l'activation de la PDE3B (phosphodiesterase 3B) (110).

En parallèle dans l'adipocyte, l'insuline favorise la lipogenèse en activant SREBPc1 selon des mécanismes identiques à l'hépatocyte, mais avec également via d'autres cibles de l'adipogenèse comme PPAR γ (111). Insuline combine à la lipogenèse, l'augmentation de l'absorption des acides gras (dans l'adipocyte et le muscle) en augmentation la translocation membranaire des protéines FATP 1 et 4. A ces mécanismes se cumulent, l'augmentation de la ré-estérification des acides gras à partir du glycérol (112).

L'adipocyte contribue, tout comme le myocyte à l'absorption du glucose plasmatique et dans une moindre mesure à la glycogénogenèse, en exprimant à la membrane le récepteur GLUT-4. Les voies métaboliques y sont identiques à celle du myocyte.

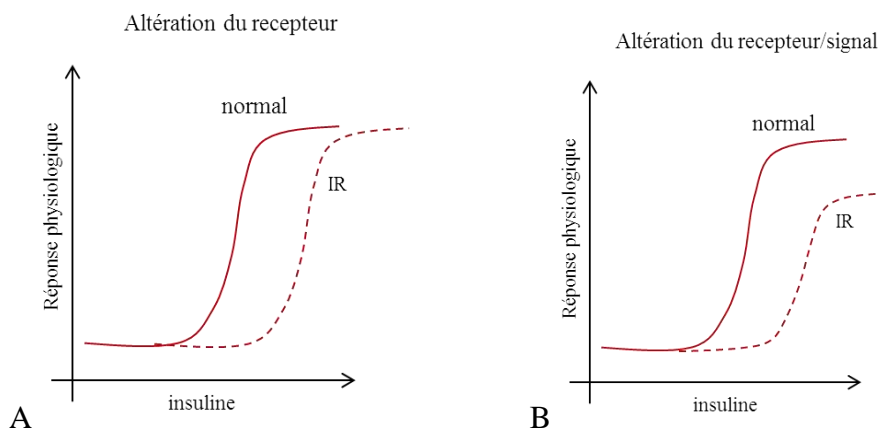
Les mécanismes d'action de l'insuline dans le tissu adipeux (104).



2. Insulinorésistance.

L'insulinorésistance correspond à une réponse altérée du métabolisme à l'insuline, menant à une captation et une utilisation réduite du glucose, provoquant *in fine* l'hyperglycémie et l'installation progressive du diabète de type 2. Physiologiquement, l'IR se définit comme un phénomène compensatoire d'hypersécrétion d'insuline afin de maintenir l'homéostasie glucidique. L'IR survient dans un contexte d'augmentation de la masse adipeuse principalement omentale, schématiquement symbolisée par l'obésité androïde. Cliniquement, l'IR est associé au pré-diabète, à la lipodystrophie, au syndrome des ovaires polykystiques et à la stéatopathie métabolique.

La modélisation physiopathologique de l'IR propose deux modèles : l'un (modèle A) en faveur d'une atteinte des récepteurs membranaires de l'insuline (quantité, fonctionnalité etc), l'autre (modèle B) associant une atteinte des récepteurs et une altération du signal ou de réponse intra-cellulaire à la stimulation. La seconde modélisation se rapproche le plus de la physiopathologie. (*D'après Perterson et al Physiol Rev 2018*) (104)



A l'instar de l'insuline dont les fonctionnalités et les mécanismes d'actions varient d'un tissu à l'autre (cf. paragraphe précédent), les mécanismes physiopathologiques de l'IR se modifient en fonction de l'organe ciblé : foie, muscle et tissu adipeux. Usuellement, deux types d'IR se distinguent : l'un périphérique (ou musculaire), l'autre centrale (ou hépatique).

Quel que soit sa nature, centrale ou périphérique, les lipides sont étroitement liés à l'IR. Ainsi, expérimentalement, la perfusion de lipide perturbe le transport du glucose intracellulaire et provoque l'IR (113). Toutefois, l'ensemble des acides gras ne peuvent être incriminés qu'ils soient circulant ou intracellulaire, saturée, insaturée, libre, céramide, prostaglandines, triglycéride ou leur composés intermédiaires (ex diacylgcérol). Les principales études orientent vers un rôle majeur du diacylgcérol (DAG) et dans une moindre mesure des céramides et sphingolipide.

a. Insulinorésistance musculaire.

L'IR musculaire pourrait se résumer en une altération des capacités d'absorption du glucose par le myocyte. Elle est fortement impliquée dans l'IR secondaire à l'obésité (114). La captation du glucose par le muscle est insulinodépendante et découle de l'expression du transporteur membranaire GLUT-4. L'atteinte de GLUT-4, résulte d'une diminution de fonction de phosphorylation de INSR altérant la cascade de transduction du signal passant par IRS-1, PI3K et la voie AKT (115). L'atteinte de l'activité d'AKT restreint l'expression membranaire de GLUT-4 ainsi qu'à son expression transcriptionnelle (104,116). En conséquence, le métabolisme glucidique s'altère avec une diminution de la glycogénèse musculaire.

b. Insulinorésistance hépatique : Paradoxe

L'insulinosensibilité hépatique se définit comme la capacité de l'insuline à inhiber la néoglucogénèse hépatique (production de glucose par le foie) et la lipolyse. Ainsi au cours du jeun, chez les sujets insulinorésistants, les taux circulants d'insuline ne sont pas en mesure de d'inhiber la production de glucose qui est significativement augmentée. Dans cette situation, il serait attendu que la lipolyse soit également augmentée. De manière surprenante et inattendue, le métabolisme lipidique reste sensible à l'insuline, entraînant une lipogénèse de novo hépatique accrue. Il s'agit du paradoxe de l'insulino-résistance hépatique (104).

Le métabolisme glucidique hépatocytaire comprend 3 fonctions essentielles : la néoglucogénèse, la glycogénèse et la glycogénolyse. A l'échelle cellulaire, l'effet inhibiteur de la néoglucogénèse est sous le contrôle du facteur de transcription FOXO1 (117). L'atteinte fonctionnelle du récepteur à l'insuline induit une surexpression et une suractivité de FOXO1, maintenant l'activité de néoglucogénèse. Ainsi, les études translationnelles confirment le lien entre l'intensité d'expression de FOXO1 et à la sévérité de la stéatopathie métabolique et du diabète de type 2.

La glycogénolyse et l'activation de la glycogénèse semblent altérées au cours de l'IR. Des études de mesure du stock de glycogène intra-hépatique en postprandiale décrivent une altération des stocks de glycogène chez les patients diabétiques de type 2. Leurs liens avec l'action directe de l'insuline semblent plus complexes. En effet, l'activité de la GS (Glycogène Synthase) est sous le contrôle de l'hyperglycémie. En effet, le transporteur GLUT-2 est indépendant de l'insuline. GLUT-2 assure l'entrée cytoplasmique du glucose, maintenant l'activité enzymatique de la GS et le métabolisme du glycogène (118).

Physiologiquement l'insuline régule le métabolisme lipidique en activant la lipogenèse de novo et en réduisant la circulation des TG. Au cours de l'IR, la lipogenèse intra hépatique reste sensible à l'insuline et augmente avec les taux élevés d'insuline circulante. L'hyperinsulinémie participe donc à entretenir le stockage des lipides dans le foie. Si FOXO1 semble central dans le métabolisme glucidique, c'est bien SREBP1c qui régulent le métabolisme lipidique intra-hépatique.

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette dissociation mécanistique entre FOXO1 et SREBP1c. La première est une affinité différente à l'insuline et a son récepteur. FOXO1 serait plus nettement plus sensible à l'insuline que SREBP1c (104). La seconde hypothèse serait que la lipogenèse de novo serait sous le contrôle d'une seconde enzyme, indépendante de l'insuline, mais sensible au glucose : ChREBP. Enfin, l'alimentation « moderne » est très fortement enrichie en fructose, dont la métabolisation est indépendante de l'insuline et induit la lipogenèse de novo après transformation en trioses-phosphate.

Ainsi, même si SREBP1c est en partie régulée dans son fonctionnement au cours de l'IR, les voies alternatives telle que mTORC1 et ChREBP participe à l'augmentation de la lipogenèse de novo, qui est très augmentée au cours de la stéatopathie métabolique (119).

c. Genèse de l'insulinorésistance : de l'obésité, à la NAFLD et au diabète.

L'obésité provoquée par une surnutrition (excès calorique) et une alimentation déséquilibrée (excès en hydrate de carbones, sucrose et en fructose) est fortement corrélée à la présence d'une stéatose métabolique. Ainsi, à titre d'illustration, la nutrition « moderne »,

industrialisée composée d'aliments transformés enrichis en sirop de maïs, riche en fructose est associée à l'obésité et à la présence d'une stéatose hépatique chez l'adulte et l'enfant. Le fructose possède la particularité d'être métabolisé par le foie dans un processus indépendant de l'insuline. Ainsi, le fructose rapidement transformé en trioses-phosphate stimule la lipogenèse *de novo* hépatique. De plus, la suralimentation, et l'utilisation plus importante des antibiotiques depuis les dernières décennies, la diminution de l'allaitement maternelle influencent la composition de notre microbiote intestinal. De nombreuses études soulignent le lien entre la composition du microbiote et l'obésité mais également la constitution de la stéatopathie métabolique (120).

Au cours de l'obésité, il existe une potentielle dysrégulation des hormones orexigènes et anorexigènes (leptine/ghréline). La leptine, hormone du tissu adipeux semble réguler en partie la satiété, mais aussi les stocks et la répartition de la masse grasse de l'organisme. Au cours de l'obésité, les taux de leptine augmentent. Son effet anorexigène semble moindre, suggérant une résistance à la leptine. Cette résistance est en partie attribuée à une diminution de capacité de la leptine à franchir la barrière hémato-encéphalique (121). Toutefois, la leptine semble réguler les flux hépatiques lipidiques de manière indépendante de son effet anorexigène (122). Ainsi, la leptine permet d'augmenter l'export de VLDL hépatique, et améliore la stéatose. C'est ainsi qu'au cours du traitement des lipodystrophies, la leptine permettrait de traiter la stéatose et la stéatohépatite grâce à ce processus de « defatting ». La leptine participerait à alimenter en VLDL les tissus adipeux et repartir la masse grasse de l'organisme, validant ainsi l'hypothèse d'une atteinte secondaire du tissu adipeux. La stéatose surviendrait quand ce processus serait dépassé.

La constitution d'une stéatose hépatique semble être l'élément déclencheur de l'insulinorésistance. L'atteinte hépatique, plus spécifiquement la stéatose, est plus fortement corrélée à l'insulinorésistance que la graisse abdominale ou viscérale/omentale. Ce qui

suggère que l'atteinte hépatique semble plus précoce que l'atteinte du tissu adipeux. A titre de validation expérimentale, l'ablation chirurgicale de la graisse viscérale chez l'homme n'a aucun impact sur l'insulinorésistance (123).

Lipides intra hépatiques et insulino-résistance : DAG, céramides

Diacylglycérol

Avec l'augmentation de la lipogénèse intra hépatique, les métabolites des triglycérides et notamment le diacylglycérol (DAG) s'accumule dans le foie. Les DAG seraient un des responsables de l'IR. En effet, la concentration de DAG intra-hépatique est corrélée à la sévérité l'IR hépatique (124,125), tout comme la présence de DAG intra-hépatique est prédictive de son développement (126). Cette hypothèse est confirmée expérimentalement, puisque l'injection de DAG favorise le développement de l'IR. Au niveau hépatique, il a été démontré que les DAG inhibaient la PKC ϵ , qui réduit les capacités de phosphorylation intra-hépatique du récepteur à l'insuline. Au niveau du muscle, les DAG affectent la PKC θ diminuant l'activité du récepteur à l'insuline mais aussi réduisant la translocation de GLUT-4 à la membrane du myocyte.

Sphingolipides et céramides

Les sphingolipides, lipides complexe proviennent de la fusion entre la serine et le palmitoyl CO-A et présents dans les membranes cellulaires engendrent de nombreuses catégories de lipides différentes. Historiquement, l'implication des sphingolipides dans les mécanismes physiopathologiques de l'insulino-résistance, proviennent des constatations expérimentales des capacités inhibitrices de la sphingosine et la sphinganine sur l'absorption du glucose et la lipogénèse dans l'adipocytes. Les céramides, qui correspondent à l'association de la sphingosine et d'un acide gras saturé, ont été très rapidement étudiées,

surtout en utilisant des dérivés du palmitate. Dans ces modèles expérimentaux, ils ont souvent été administrés à des concentrations supra-physiologiques, perturbant ainsi la compréhension de leur impact réelle sur la physiopathologie. Toutefois, de nombreuses études se corroborent et retrouvent des capacités d'inhibition des céramides sur l'INSR, ou en ciblant négativement les voies AKT (Cascade INSR-IRS-PI3K-AKT), ou directement AKT (104,127). Un des principaux biais expérimentaux rapportés fréquemment par *Schulman GI et al*, concerne le fait que ces études ont le plus souvent utilisés de la myriocin, qui correspond à un inhibiteur de la serine-palmitoyltransferase, première enzyme impliquée dans la synthèse des sphingolipides. Or *Schulman et al* rapporte que la myriocin augmente également les concentrations intra-cellulaires de DAG et formule l'hypothèse qu'une partie des résultats publiés pourraient être biaisé. La littérature semble imputer à la fois les céramides et le DAG, car une étude de « *lipidomic* » récentes retrouvaient une association significativement entre l'HOMA-IR et les céramides mais aussi le DAG (128).

Partie 4 : Prise en charge de la stéatopathie métabolique.

1. Généralités

L'augmentation des risques de mortalité cardiovasculaire, carcinologique et hépatique des patients atteints de NASH nécessite que les options thérapeutiques ciblent ces trois composantes. A minima, les traitements ne doivent pas aggraver l'une d'entre elle, tout en réduisant significativement les risques de morbi-mortalité hépatiques. Considérant le profil des patients atteints de stéatopathie métabolique habituellement en surpoids, insulino-résistants ou diabétiques, la perte de poids apparaît comme une option simple, peu dangereuse et amène à réduire l'ensemble des complications des comorbidités de ces patients. Les règles hygiéno-diététiques et l'augmentation de l'activité physique sont reconnues comme le traitement de première intention de la stéatopathie métabolique. Toutes les sociétés savantes internationales les recommandent (2,5). La réponse histologique hépatique dépend de l'importance de la perte de poids. Des seuils peuvent être identifiés. A partir de 3-5% de perte de poids la stéatose s'améliore significativement, l'inflammation et la NASH ne s'améliorent ou disparaissent qu'à partir de 7 à 10% de perte de poids (129). Lors que ces seuils sont obtenus, la probabilité de rémission histologique atteint les 60 à 90%. En cas de disparition de la NASH et de plus de 10% de perte de poids, la fibrose est susceptible de s'améliorer. La principale problématique de cette prise en charge, notamment pour les formes sévères est en lien avec le faible pourcentage de patients qui arrivent à atteindre ces objectifs de perte de poids. Dans les études randomisées, au sein de population sélectionnée, seul 10% des patients y parviennent à deux ans. De plus, près de 50% de ces mêmes patients reprendront du poids

dans les 5 années suivantes. Des alternatives thérapeutiques pharmacologiques voir chirurgicales sont alors nécessaires.

Parmi les traitements pharmacologiques ayant été testés ou en cours de développement, différentes voies physiopathologiques ont été ciblées et expérimentées. Ces axes (résumé par le schéma ci-dessous) sont l'insulinorésistance hépatique, la réduction de l'inflammation via les anti-oxydants, la modulation de l'apoptose, la réduction de la stéatose via les traitements hypolipémiant, ou la diminution de la fibrogenèse hépatique. Ces traitements sont développés dans la revue de la littérature publiée et présenté ci-après.

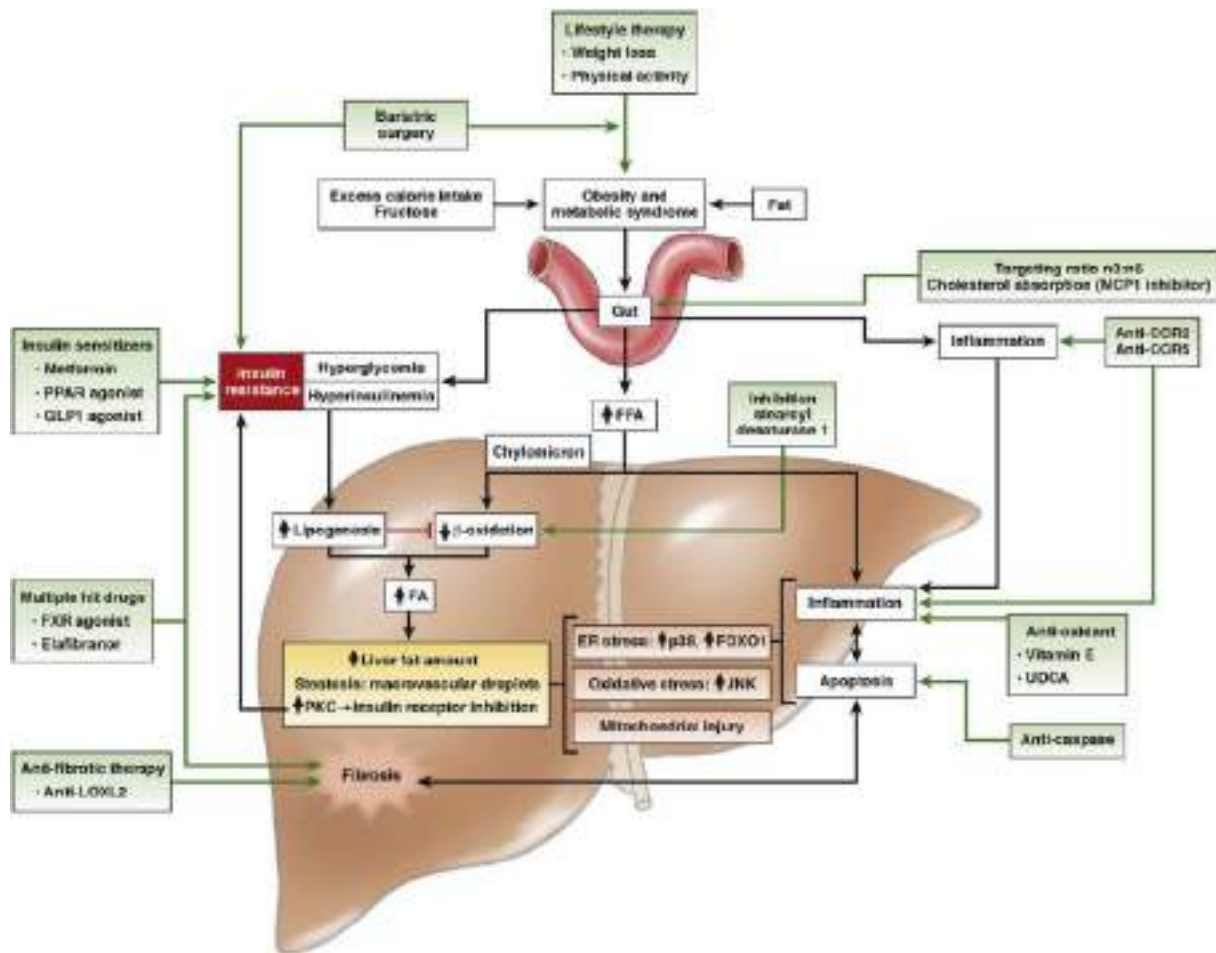


Schéma publié dans G. Lassailly et al, Gastroenterology 2016 (130)

2. Traitements la stéatohépatite métabolique, NASH.

Manuscrit: Perspectives on treatment for non-alcoholic steatohepatitis.

Publication 2016

Auteurs:

G. Lassailly, R. Caiazzo, F. Pattou et Philippe Mathurin.(130)

Manuscrit présenté en annexe à la fin du manuscrit.

3. Actualisation des données concernant les traitements pharmacologiques de la NASH.

Depuis la parution de ce manuscrit plusieurs études randomisées ont été publiées. Elles apportent des informations complémentaires sur les perspectives thérapeutiques.

a. Traitement anti-fibrosant

Le cenicriviroc (antagoniste CCR-2 & CCR-5) a été évalué en phase IIb versus placebo dans un essai randomisé contrôlé : 289 patients ont été inclus et traités avec 50 mg de cenicriviroc vs placebo. L'objectif principal de l'étude, qui correspondait à une réduction de 2 points de NAS score sans aggravation de la fibrose n'était pas atteint. Alors que l'objectif secondaire de l'étude sur la diminution de la fibrose était atteinte dans 20 % des patients contre 10 % des patients dans le bras placebo. En raison de son impact sur la diminution de la fibrose ce traitement est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase III. Le positionnement thérapeutique du cenicriviroc sera probablement celui d'une association avec d'autres traitements ciblant plus spécifiquement l'inflammation et de la stéatose (131).

Les inhibiteurs apoptotiques et plus spécifiquement les inhibiteurs ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) ont longtemps été considérés comme des cibles prometteuses du traitement de la NASH. La voie ASK1 était reconnue comme l'un des voies promotrices de la fibrogénèse dans la NASH. Le traitement par Selonsertib inhibiteur ASK1 a été testé chez les patients porteurs d'une NASH avec fibrose avancée (F3) (essai Stellar III) et chez les patients avec une cirrhose compensée (essai Stellar IV). Les deux

essais sont négatifs sur le critère de jugement principal correspondant à une diminution du stade de fibrose de 1 point après 48 semaines de traitement (132).

b. Traitement anti-oxydants

L'acide ursodésoxycholique ou AUDC a été testé à de très nombreuses reprises pour le traitement de la NASH en raison de son excellente tolérance et de sa capacité à diminué de manière significative les perturbations du bilan hépatique. Toutefois, aucun essai clinique n'a permis de démontrer l'efficacité de l'AUDC. L'AUDC est reconnu aujourd'hui comme inefficace pour le traitement de la NASH.

Plus récemment, l'acide norursodesoxycholique, homologue à chaîne latérale courte de l'AUDC dont l'activité est principalement hépatique. Ce traitement a été évalué dans le NASH avec deux doses de traitement contre le placebo. Le critère de jugement principal était la réduction des transaminases qui était observé dans les deux bras de traitement en comparaison au placebo. Toutefois, l'absence de données histologiques ne permet pas pour le moment de déterminer si le norAUDC est susceptible d'avoir un effet différent de celui bien connu et décrit de l'AUDC (133).

c. Traitement multi-cibles et régulateurs du métabolisme énergétique.

L'acide obéticholique (AOC) est agoniste FXR, avec une action multi-cible (134). L'AOC réduit l'insulino-résistance, la fibrogenèse et la réponse inflammatoire (135). En essai de phase II, l'AOC avait permis d'atteindre le critère de jugement principal au cours de l'analyse intermédiaire de l'étude, mettant fin à l'essai (136). Au cours de l'essai de phase III, l'analyse préliminaire sur le critère de jugement principal composite (disparition de la NASH sans aggravation de la fibrose ou amélioration de la fibrose sans aggravation

de la NASH) retrouvait une différence significative entre le traitement par AOC à la posologie de 10 et 25 mg/jour comparativement au placebo avec : 12% vs. 18% à 10 mg vs 23% à 25 mg. Toutefois, bien que positif, cette étude révèle des difficultés d'observance au long court en raison des nombreux cas de prurit décrits les patients traités à la posologie de 25 mg/jour (50% de prurit) (137).

Les analogues du FGF 19 et 21 ont été développés et testés dans la NASH. Le rationnel physiopathologique de l'utilisation de ces facteurs de croissance provient du retentissement important de la sous-famille FGF19 comprenant le FGF 19, 21 et 23 sur le métabolisme glucidique, lipidique hépatique (138). Toutefois, l'utilisation des analogues du FGF21 nécessite la plus grande prudence en raison de sa surexpression en contexte carcinologique comme dans cancer du rein et du sein (139,140). Toutefois le rôle du FGF21 reste encore flou. Il semble qu'il soit associé au pronostic et à l'agressivité tumorale, mais son lien dans la carcinogénèse est à explorer. Toutefois, dans le contexte du syndrome métabolique, le FGF 19 et 21 apparaissent comme des alternatives thérapeutiques intéressantes. Dans un essai de phase 2, le Pegbelfermin (BMS-98-6036), analogue du FGF 21, administré chez le patient obèse n'influence pas l'hémoglobine glyquée, mais améliore l'équilibre lipidique en augmentant les HDL et en réduisant le taux circulant de triglycérides (141). Chez les patients NASH, il réduit significativement la stéatose. Toutefois, les données histologiques sont nécessaires pour déterminer son effet sur la NASH (142). Quant à l'analogue du FGF 19 (NGM-282) ce dernier également évalué chez les patients atteints de stéatohépatite avec une fibrose F1-F3 et sans cirrhose améliore significativement le taux de graisse intra-hépatique après 3 mois de traitement (143).

Avec les mêmes perspectives physiologiques de régulation du métabolisme énergétique, les analogues du récepteur β de la thyroïde semblent prometteurs en raison de leurs fortes expressions hépatiques. Le MGL-3196 ou Resmetirom, administré *per os*, réduisait significativement la graisse intra-hépatique évalué en IRM après 12 et 36 semaines de traitement -30% de stéatose (après 12 semaine). L'impact biologique sur les transaminases semblait confirmer l'évolution de la stéatose. Tout comme pour les analogues FGF 19 et 21 des données histologiques sont indispensables et nécessaires pour valider son traitement dans la NASH (144).

d. Avancés dans le traitement de la cirrhose NASH

Le traitement de la cirrhose et la réduction de sa morbi-mortalité apparaissent comme une priorité. L'inhibition de la Galectine 3 semble relativement sûr et permettrait de réduire l'hypertension portale tout comme la fibrogénèse. Une étude de phase IIb utilisant le GRMD-02 (belapectin) en perfusion bi-hebdomadaire chez les patients avec une cirrhose NASH et une hypertension portale aux posologies de 2 mg/kg, 8 mg/kg ou placebo pendant 1 an a été effectué. Le critère de jugement était une réduction du gradient de pression, les critères de jugements secondaires étaient la modification de l'histologie hépatique. Malheureusement, il n'existait pas d'effet sur la réduction du gradient de pression après 1 an de traitement quel que soit la posologie utilisée en comparaison au placebo. Toutefois, chez les patients les moins grave, c'est à dire sans varices œsophagiennes (VO), le traitement réduisait l'hypertension portale et semblait diminuer la probabilité de survenue de nouvelles VO (145).

Malgré toutes ces innovations thérapeutiques, aucune ne semble plus efficace que la perte de poids. Si les traitements pharmacologiques amaigrissants n'ont pas démontré leur

intérêt dans le traitement de la NASH, la chirurgie bariatrique chez l'obèse morbide afin d'induire une perte de poids majeure et durable apparaît comme une option de plus en plus solide.

e. La chirurgie bariatrique, une alternative au traitement pharmacologique ?

La chirurgie bariatrique a prouvé ses nombreux bénéfices en dehors de son effet durable sur la perte de poids. Ainsi, chez l'obèse morbide, quel que soit la technique chirurgicale étudiée, la chirurgie de l'obésité diminue la mortalité globale et permet aux patients de retrouver une espérance de vie comparable à celle de la population générale (146,147). Son effet cardiovasculaire est significatif, avec une diminution des événements ischémiques (148,149). La perte de poids réduit également le risque de survenue du cancer du sein (147). A l'échelle métabolique, la chirurgie bariatrique permet la rémission du diabète chez près de 30% des patients à 1 et 5 ans (150,151). Elle optimise l'équilibre glycémique chez l'ensemble des patients initialement en situation d'échec médical. Dans ce contexte très spécifique la chirurgie bariatrique a été étendue aux patients diabétiques obèses avec un IMC supérieur à 28 kg/m². L'effet bénéfique sur l'équilibre glycémique a permis à la FDA d'autoriser l'usage de l'anneau gastrique chez les patients avec un IMC entre 30 et 35 kg/m² dans un contexte de diabète difficile à traiter.

Grâce à son effet amaigrissant, son optimisation de l'insulino-résistance, le retentissement de la chirurgie sur le foie était potentiellement attendu comme bénéfique. Néanmoins, cette démonstration n'a pu se faire à partir des années 2000. En effet, les premières publications concernant la chirurgie de l'obésité avec des techniques chirurgicales utilisées pendant les années 1970-1980 (duodéнал switch, ou bypass iléo-jéjunal) soulignaient au contraire un risque de complications hépatiques très significatives

avec des risques majeurs d'hépatite de dénutrition et près de 7% de cirrhose 5 ans après l'intervention (152). Depuis l'abandon de ces techniques chirurgicales, les complications hépatiques sont devenues beaucoup plus rares. Elles sont encore décrites chez les patients bénéficiant de bypass en Ω en cas d'anse montée trop courte responsable de dénutrition majeure (153).

Ainsi, plusieurs études princeps ont étudié l'effet hépatique et histologique de la chirurgie bariatrique chez l'obèse morbide. Elles retrouvaient une amélioration majeure de la stéatose au décours de l'intervention. Cet effet semblait associé à la réponse métabolique globale du patient et notamment sur l'amélioration de son insulino-résistance (154). Dans le contexte de la stéatopathie métabolique, la chirurgie permet une réponse et un contrôle durable de la maladie jusqu'à 5 ans après l'intervention. Toutefois, parmi ces patients peu sévères à la date de l'intervention (95% d'entre eux avaient une fibrose \geq F1), il existait une aggravation statistique de la fibrose à 5 ans. Les patients restaient toutefois dans une zone histologique F0-F1 (155). On peut évoquer des fluctuations d'échantillonnages biopsiques ou le contrôle imparfait de la pathologie chez quelques patients. L'impact clinique semble toutefois négligeable car ces patients ont initialement une pathologie peu sévère et un faible risque de mortalité hépatique. Des données complémentaires étaient nécessaires pour les patients les plus graves.

Les résultats de la chirurgie bariatrique chez les patients porteurs d'une NASH étaient prometteurs et très encourageants. Les premières études portant sur de petites cohortes de patients, avec un risque de biais de sélection retrouvait, dans des délais variables après l'intervention, près de 80 à 90% de disparition de la stéatohépatite (156). La mise en place d'une stratégie de biopsies systématiques et programmées 1 et 5 ans a fait disparaître ces biais améliorant l'analyse de l'impact de la chirurgie sur le foie.

Efficacité de la chirurgie bariatrique sur la NASH chez l'obèse morbide.

Etude 1. Effet de la chirurgie bariatrique chez les patients présentant une NASH histologiquement prouvée.

Manuscrit publié dans Gastroenterology en 2015

Liste des auteurs : *Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, Raverdy V, Leteurtre E, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Duhamel A, Pattou F, Mathurin P.*

Résumé de l'article.

Afin de déterminer l'effet de la chirurgie bariatrique sur la stéatohépatite, 109 patients avec une stéatohépatite définie histologiquement par l'anatomopathologiste ont été inclus au sein de la cohorte de chirurgie bariatrique du CHU de Lille

Méthodologie : Des données cliniques, biologiques et histologiques ont été recueillies avant et 1 an après chirurgie et comparées à celle de baseline. Chaque patient était son propre témoin.

Résultats : Sur une durée de près de vingt ans, (délai d'inclusion 1994-2013) 1489 ont bénéficié d'une chirurgie bariatrique au CHU de Lille avec le jour de l'intervention une biopsie hépatique. Seulement 44 patients n'ont pas bénéficié de la biopsie baseline sur cette période soit près de 97% d'exhaustivité. Au total, 109 patients avec une NASH prouvée histologiquement ont été inclus, parmi eux 82 bénéficiaient d'une biopsie à baseline et à 1 an.

NASH avait disparu dans 85% des patients (intervalle de confiance de 95% [CI] 75.8%-92.2%). Comparativement à avant la chirurgie, les patients ont eu des réductions significatives de l'indice moyen \pm SD de masse corporelle (IMC, de $49,3 \pm 8,2$ à $37,4 \pm 7$). Les perturbations initiale du bilan hépatique étaient corrigées à 1 an ALAT ($52,1 \pm$

25,7 UI/L à $25,1 \pm 20$ UI/L); γ GT 51 UI/L ([IQR], 34-87 UI/L) à 23 UI/L (IQR, 14-33 UI/L). L'insulino-résistance diminuait significativement de $3,6 \pm 0,5$ à $2,9 \pm 0,5$. ($p < 0,01$ pour toutes les analyses)

La sévérité de l'activité inflammatoire de la maladie initiale définie par le score Brunt influençait la disparition histologique de la NASH avec 94% de rémission pour le stade 1 de Brunt vs 70% pour le stade 3.

L'évolution de chacun des paramètres histologiques au décours de la chirurgie révèle une diminution du pourcentage de stéatose de 60% (IQR, 40%-80%) à 10% (IQR, 2,5%-21,3%). La ballonnisation hépatocytaire disparaissait dans 82% des cas. L'activité histologique définie par le score NAS se réduisait de 5 (IQR, 4-5) à 1 (IQR, 1-2) (chaque $P < .001$). La ballonnisation hépatocellulaire disparaissait dans 84,2 % des cas (IC à 95 % : 74,4-91,3) et inflammation lobulaire dans 67,1 % des cas (IC à 95 % : 55,8-77,1). La fibrose diminuait dans 33,8 % des patients (IC à 95 % : 23,6 % à 45,2 %) et chez près d'un patient sur deux si l'on considérait le groupe de patient avec une fibrose à l'inclusion.

La persistance de la NASH était associée à une perte de poids significativement moins importante (variation de l'IMC, $9,1 \pm 1,5$) vs. (variation de l'IMC, $12,3 \pm 0,6$) ($P = 0,005$). Concernant l'analyse des techniques chirurgicales, l'anneau gastrique semblait moins efficace que le bypass. L'étude est présentée dans le manuscrit ci-après.

Etude 2. La chirurgie bariatrique permet la rémission de la NASH et la régression de la fibrose à long terme.

Manuscrit publié en 2020 dans Gastroenterology

Liste des Auteurs : *Guillaume Lassailly, Robert Caiazzo, Line-Carolle Ntandja-Wandji, Viviane Gnemmi, Grégoire Baud, Hélène Verkindt, Massih Ningarhari, Alexandre Louvet, Emmanuelle Leteurre, Violeta Raverdy, Sébastien Dharancy, François Pattou, Philippe Mathurin*

Contexte : Une des principales questions et problématique dans la prise en charge des maladies métaboliques consiste dans le maintien du bénéfice induit par le traitement et dans la poursuite de l'équilibre métabolique. La NASH peut récidiver et ainsi favoriser le développement de la fibrose et de la cirrhose. La littérature ne fournit aucune donnée sur les résultats hépatique à long terme de la chirurgie bariatrique.

L'objectif de cette nouvelle étude est de suivre prospectivement l'évolution des patients avec des biopsies répétées le jour de la chirurgie, 1 an après et 5 ans plus tard.

Méthodologie : Etude prospective de 180 patients atteints de NASH prouvée histologiquement suivis pendant 5 ans au CHU de Lille. Nous avons obtenu des biopsies hépatiques de 125 des 169 patients (76%) ayant atteint 1 an et 64 des 94 patients (68%) ayant atteint 5 ans après la chirurgie. Le critère de jugement principal était la résolution de NASH sans aggravation de la fibrose à 5 ans. Les critères de jugement secondaire étaient l'amélioration de la fibrose (réduction de ≥ 1 stade) à 5 ans et la régression de la fibrose et de la NASH à 1 et 5 ans.

Résultats : À 5 ans après la chirurgie bariatrique, la rémission de la NASH sans aggravation de la fibrose était observée chez 84% des patients (IC 95%, 73.1-92.2). La fibrose s'améliorait significativement en comparaison avec l'histologie réalisée le jour de la chirurgie dans 70,2 % des cas (IC à 95 %, 56,6-81,6). La fibrose a disparu dans 56 % de la

cohorte (IC à 95 %, 42,4-69,3) chez près de 45,5 % des patients avec une fibrose avancée au diagnostic.

Par ailleurs la persistance d'une activité inflammatoire (persistance de la NASH à l'histologie) ne s'accompagnait pas d'une amélioration de la fibrose. Tout comme à 1 an, l'absence de réponse histologique (disparition de la NASH) était associé à une perte de poids significativement moins importante ($-6,3 \pm 4,1$ kg/m² vs. $13,4 \pm 7,4$ kg/m²; P = 0,017). Le bénéfice sur la NASH était observé au cours de la première année et était maintenu jusqu'à 5 ans, sans récurrence de la maladie. L'amélioration de la fibrose était un processus continu, entre la chirurgie et la cinquième année post opératoire, initié à la disparition du processus inflammatoire sous-jacent (NASH). De même que pour l'étude précédente à 1 an, le bypass semblait plus efficace que l'anneau gastrique en termes de réponse histologique à 5 ans.

Manuscrit du protocole NASHsurg : Etude de la chirurgie bariatrique comme traitement des formes sévères de NASH chez l'obèse non morbide. PHRC Nationale (étude NASHsurg)

L'étude NASHsurg est un essai clinique comparant l'efficacité de la chirurgie bariatrique pour le traitement de la NASH avec fibrose avancée au traitement médical.

Cette étude est financée en qualité de PHRC nationale. Elle inclut de nombreux centres français et belge.

Le détail du protocole est fourni à la fin du manuscrit.

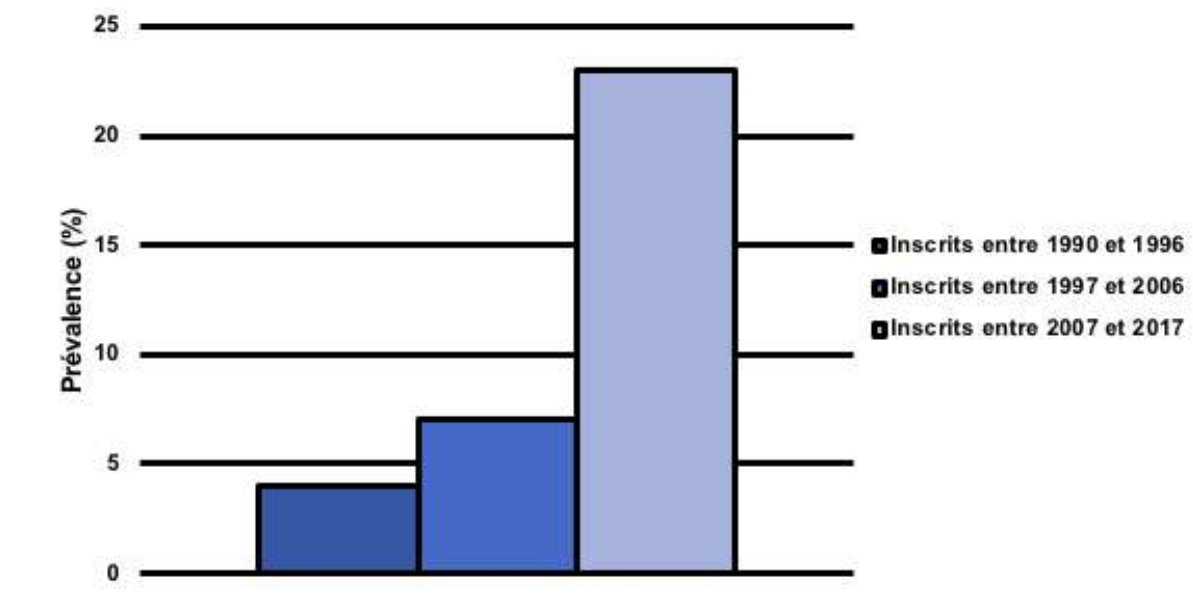
4. Prise en charge de stéatopathie métabolique et de l'obésité dans le contexte de la transplantation hépatique.

a. Impact de l'obésité chez les candidats à la greffe hépatique.

La transplantation hépatique représente la seule option thérapeutique curative de la cirrhose décompensée et du carcinome hépatocellulaire (CHC). Depuis les années 1980-1990, la survie après transplantation hépatique s'améliore grâce aux progrès chirurgicaux ainsi qu'à l'avènement des anti-calcineurines (ciclosporine puis du tacrolimus) (157). La survie post greffe à un an s'est améliorée de 50% à 85-90% entre les années 1980 et 2010 (158). Les indications de transplantation se sont élargies progressivement depuis les pathologies malformatives, auto-immunes, aux pathologies virales jusqu' à l'alcool et au CHC. Depuis maintenant une dizaine d'année, la NASH s'impose comme une indication de plus en plus fréquente que ce soit pour insuffisance hépatocellulaire ou CHC, d'autant plus que les traitement anti-viraux de l'hépatite C ont réduit significativement le nombre de patients VHC sur liste d'attente (91). La cirrhose métabolique est actuellement l'indication qui croit la plus rapidement aux USA. En conséquence, le profil du candidat à la greffe a changé. L'âge médian sur liste de greffe augmente tout comme la prévalence de l'obésité qui a bondit de près de 45% entre 2000 et 2015 aux USA (159). L'obésité s'installe comme une comorbidité fréquente chez les candidats à la greffe, à titre d'exemple aux USA près de 14% des patients sont obèses morbides. Cette augmentation n'est pas sans effet pour les patients. En effet, plusieurs travaux s'appuyant sur les données UNOS relatent retentissement délétère de l'obésité sévère et morbide : augmentation plus de risque de décès et de sortie de liste pour aggravation de leur pathologie et diminution de l'accès à la greffe (160,161).

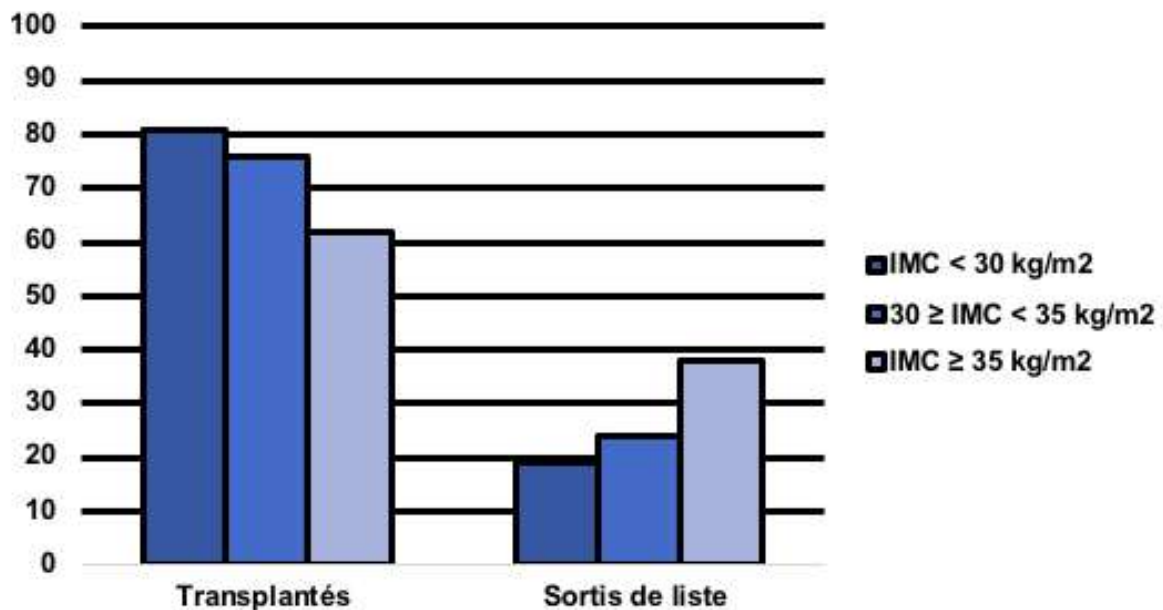
b. Données locales (CHU de Lille) sur l'évolution de l'obésité chez les candidats à la transplantation hépatique.

Il existe peu de données nationales, sur la prévalence de l'obésité sur liste et sur ses conséquences. Avant, l'analyse des données nationale de la base CRISTAL, nous avons mené un travail d'analyse des patients inscrits sur liste au CHU de Lille. Au total, 1393 patients ont été inscrit sur liste de greffe entre 1990 et 2017 à Lille. L'IMC moyen a augmenté de 22 kg/m² à 26,7 kg/m² (p<0.001). La prévalence de l'obésité a ainsi augmenté de 4% (1990 à 1996), à 23% (1996 à 2007) puis à 28% (2007 à 2017) (p<0.01) (extrait du travail de thèse du Dr. Mathilde Favre, figure extraite de sa thèse ci-dessous)



Cette augmentation de l'obésité sur liste de greffe semble avoir un impact négatif sur l'accès à la greffe. Les données locales, lilloise, semblent confirmer une réduction de la probabilité d'accès à la greffe en cas d'obésité, décrites dans l'analyse des données UNOS

(illustré ci-dessous, extrait de la thèse du Dr Favre). Ces données ont par la suite été étudiées au niveau national.



c. . Données nationales « CRISTAL » sur l'impact de l'obésité morbide chez les candidats à la transplantation hépatique.

Nous avons mené un travail collaboratif multicentrique d'analyse des données nationales (base de données CRISTAL) de l'agence de biomédecine sur l'impact de l'obésité morbide sur l'accès à la greffe et la mortalité sur liste d'attente. Nous nous sommes concentrés sur l'obésité morbide qui semble associée à un retentissement clinique plus que l'obésité en termes de complications post-opératoires.

Etude 3. Severe obesity increases death and dropout from the liver waiting list: a cohort analysis using the French national CRISTAL database

Auteurs: Delacôte Claire¹, Favre Mathilde², El Amrani Medhi³, Bauvin Pierre¹, Boleslawski Emmanuel³, Millet Guillaume³, Chebaro Alexandre³, Truant Stephanie³, Mathurin Philippe^{1,2}, Louvet Alexandre^{1,2}, Canva Valérie², Lebuffe Gilles⁴, Pruvot François René³, Dharancy Sébastien^{1,2}, Lassailly Guillaume^{1,2}.

And the French Liver Transplant Group

Date de Soumission : 08/10/2020, Transplantation.

Résumé :

Contexte et objectifs : L'obésité morbide est de plus en plus fréquente chez les patients candidats à la transplantation hépatique. Des données aux USA suggèrent un moins bon accès à la greffe de ces patients et une surmortalité sur liste d'attente. L'objectif de ce travail est d'étudier les facteurs influençant l'accès à la greffe et de sortie de liste ou décès. Les causes de refus de greffon ont aussi été analysées.

Méthode : L'analyse a été conduite chez les patients inscrits sur liste de greffe en France entre 2007 et 2017. Cette période correspond à celle de la politique d'allocation des greffes selon le score Foie utilisant le score MELD. Toutes les données ont été recueillies grâce à la cohorte prospective CRISTAL de l'agence de biomédecine. Les analyses ont été conduites en 2 étapes. Premièrement, les risques compétitifs ont été analysés afin de déterminer les facteurs influençant l'accès à la greffe ou la sortie de liste. Les patients sortis de liste pour raison personnelles ont été censurés. Deuxièmement, nous avons étudié les liens entre l'obésité morbide chez les candidats et les attributions et causes de refus de greffon.

Résultats : 15 184 patients ont été inscrits sur liste de greffe entre 2007 et 2017. Au moment de l'analyse, 10 813 patients étaient transplantés 2 847 étaient décédés ou sortis de liste pour aggravation, 748 sortis de liste pour amélioration et 776 censurés. Les caractéristiques des patients étaient : âge 56 ± 10.4 , sexe masculin 74.2%, 9, IMC 26.2 ± 5.3 kg/m² (6.3% obèses morbides), MELD 15.8 ± 10.7 . Les obèses morbides étaient plus âgées (55.8 ± 8.5 vs. 54.2 ± 10.5) plus souvent diabétiques (36.9 vs. 22.2%), et avaient une insuffisance hépatocellulaire plus sévère selon le score MELD (16.6 ± 11.3 vs. 15.7 ± 10.7), ainsi que plus de CHC (39.2 vs. 32.4%). Après ajustement, en analyse multivariée, l'obésité morbide, l'âge avancé, l'encéphalopathie hépatique et l'ascite étaient des facteurs indépendants de mortalité sur liste ou de décès. L'accès à la greffe était moindre chez les sujets obèses morbides. Au moins 1 greffon était proposé chez 82.6% des candidats. Avant la survenue d'un événement (greffe ou sortie de liste) 2 greffons étaient proposés en médiane (IQR :1-5) par patient. Il n'y avait pas de différence en termes de nombre de proposition entre les obèses sévères et les autres patients. Cependant, il y avait plus de refus de greffon pour raison d'incompatibilité morphologique chez les obèses morbides (14.9% vs. 12.7% ; $p < 0.01$).

Conclusion : les obèses morbides sont désavantagés sur liste de greffe, en raison d'une plus forte mortalité et d'un accès moins fréquent à la greffe. La principale cause est due à plus de refus de greffon pour incompatibilité morphologique.

PARTIE 5 : Greffons stéatosiques marginaux et ischémie reperfusion hépatique.

Le contexte de la pénurie de greffon hépatique se pérennise depuis de nombreuses années, et l'utilisation de greffons qualifiés de marginaux s'est généralisée pour représenter près d'un greffon sur deux en France. Les greffons idéaux se définissent sur les caractéristiques suivantes du donneur : âge inférieur à 40 ans, traumatisme cérébral comme cause de décès, don après mort encéphalique, stabilité hémodynamique, pas de stéatose ou toute autre lésion hépatique chronique sous-jacente, et aucune maladie transmissible» (162). Ces greffons sont rares. L'âge des donneurs augmentent depuis plusieurs décennies tout comme la prévalence de l'obésité, altérant la qualité des greffons. En conséquence, ces greffons sont sous la menace de lésions sévères d'ischémie/reperfusion (I/R) hépatique sources de non fonction primaire, de retransplantation et de décès.

La diminution du processus lésionnel d'I/R permettrait théoriquement de réduire la probabilité de non fonction primaire du greffon, mais aussi d'augmenter l'utilisation de greffon steatosique. Différentes options thérapeutiques sont à l'étude telle que des procédures de « *defatting* » au moyen de machine de perfusion hépatique. Les autres pistes cherchent à limiter l'impact lésionnel de l'I/R.

1. Ischémie reperfusion hépatique

a. Facteurs cliniques influençant la sévérité et le processus lésionnel de l'IR

Facteurs liés au donneur

Des facteurs intrinsèques aux donneurs et d'autres extrinsèques (contexte clinique du prélèvement) modulent la sévérité lésionnelle de l'I/R. Ainsi, l'âge, l'état du foie (fibrose, stéatose) sont associés à la sévérité des lésions et l'intensité de la cytolyse. Ces facteurs identifient et définissent les greffons marginaux.

La sévérité et la nature de la stéatose influencent le devenir des patients et des greffons en post TH immédiat. Les complications, notamment la non fonction primaire et la survie greffon augmentent à partir du seuil 30% de stéatose. Ces dernières deviennent non acceptables lorsque que la stéatose est supérieure à 60% (163). La caractérisation micro/macro vacuolaire de la stéatose influence les résultats et la morbidité de la TH, puisque que la présence d'une stéatose dite micro-vacuolaire ne semble pas influencer le risque de complications. A l'inverse, la stéatose macrovacuolaire supérieure à 60% constitue un motif de refus de greffon selon la conférence de consensus de Paris de mars 2007(164).

L'âge et la durée d'ischémie froide (>18h puis réduite à 12h) ont depuis plus de 30 ans été identifiés comme des facteurs influençant le risque de non fonction primaire et de fonction retardée du greffons lesquels majorent le risque de retransplantation et de mortalité post-opératoire (165). L'optimisation du transport, l'amélioration de stratégies de prélèvement, l'utilisation de liquides de transport aident à utilisation de ses greffons marginaux au quotidien. L'âge des donneurs a pu être progressivement augmenté de 40, à 50 ans puis jusqu'à 70 ans. Sous certaines conditions, l'âge de certains donneurs peut dépasser les 80 ans. Les prochaines étapes de réduction de complications pour ces greffons passeront certainement par le développement des machines de perfusion (166).

Conséquences de la mort encéphalique et des conditions cliniques préalables au prélèvement

Les donneurs proviennent pour la plupart de patient décédés de mort encéphalique. Ces patients ont été considérés en France comme des donneurs idéaux en opposition aux donneurs à « cœur arrêté » chez qui un premier épisode de bas débit ou « low flow » a potentiellement induits des lésions tissulaires compromettant l'utilisation ultérieurs des organes. Néanmoins, la mort encéphalique provoque un état pro-inflammatoire majeur, favorisant la démargination et l'accumulation des PNN dans l'ensemble des tissus. A l'échelle moléculaire, la décharge cytokinique de TNF, IL6 (etc) augmente l'expression membranaire des molécules d'adhérence ICAM et VCAM. De manière étonnante, avant même le prélèvement, les PNN s'accumulent préférentiellement dans les aires de stéatose, pouvant expliquer en partie le risque d'exacerbation lésionnelle post IR hépatique des greffons stéatosiques (167,168).

Les conditions préalables au prélèvement du greffon influencent également le processus lésionnel. Une complication infectieuse et/ou une défaillance hémodynamique haussent les concentrations d'endotoxines comme le lipopolysaccharide (LPS) dans la circulation systémique et portale (169). Elles aggravent la nécrose hépatocytaire et la sévérité lésionnelle en activant les récepteurs de l'immunité les PRR.

b. Physiopathologie de l'IR

En dehors de l'allo-immunisation, l'ischémie reperfusion hépatique concentre les principales problématiques techniques et physiopathologiques de la transplantation hépatique. Ainsi, l'I/R provoque des reprises retardées de fonction du greffon et des insuffisances hépatiques post opératoires (170), et la survenue de complications biliaires et de rejet.

De manière générale, l'I/R est un phénomène biphasique, au cours duquel, la phase d'ischémie sert de déclencheur à une réponse inflammatoire et lésionnelle qui survient à la phase de reperfusion. Histologiquement, la nécrose hépatocytaire centro-lobulaire prédomine avec à un infiltrat inflammatoire à polynucléaires neutrophiles (PNN)(171).

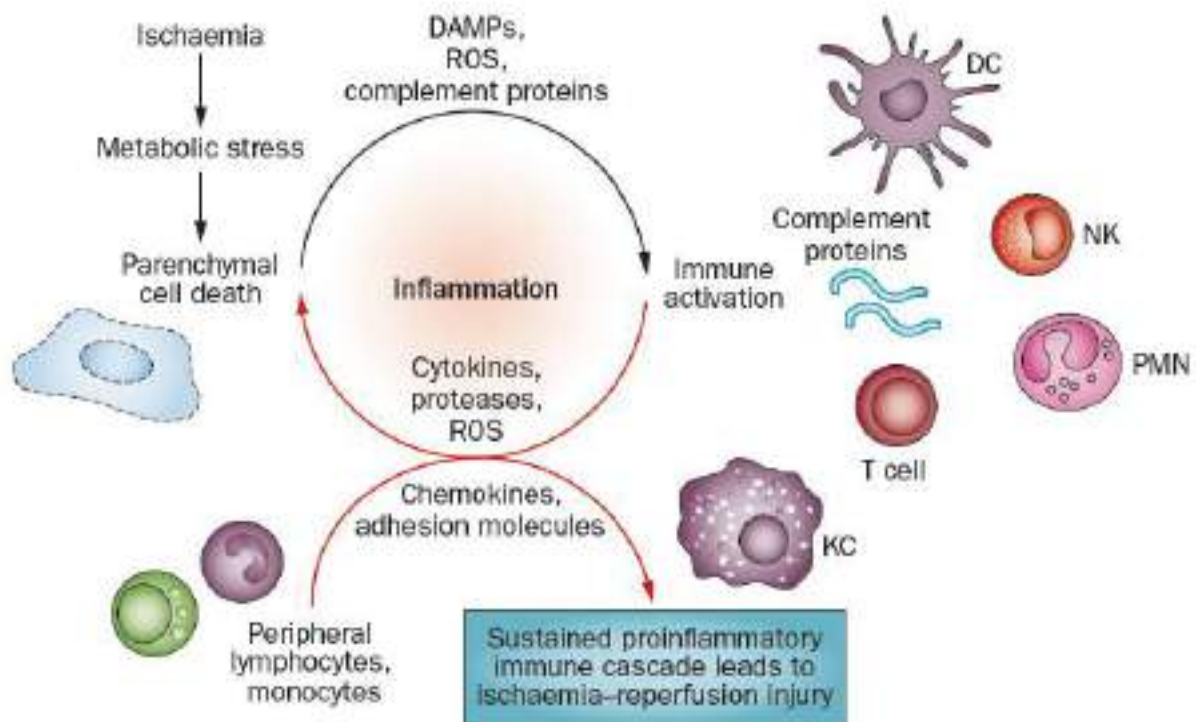
On distingue deux types d'ischémie : l'ischémie « chaude », qui survient à l'occasion de phénomène d'hypoperfusion au cours de choc hémorragique, de défaillances multi-viscérales, ou lorsque le greffon est *in situ* pendant la procédure de greffe. Les lésions observées à l'échelle cellulaire sont préférentiellement hépatocytaires. On lui oppose l'ischémie « froide » qui survient *ex vivo*, lorsqu'un greffon est explanté et conservé dans la glace avant réimplantation. Histologiquement, on parle de lésions de préservation, touchant principalement la microcirculation et le tissu endothélial. Toutefois, la distinction physiopathologique reste ténue avec des mécanismes lésionnels et des voies cellulaires communes.

Grands principes physiopathologiques de l'ischémie reperfusion hépatique.

De grands principes sont largement démontrés. La phase d'ischémie plonge le foie dans une phase de stress métabolique intense. Les réserves intra-hépatocytaires de glycogène s'épuisent, les tissus diffusent des radicaux libres (ROS), le stock énergétique d'ATP s'effondre activant des mécanismes préservations cellulaire comme les voies HIF (Hypoxia Induced Factors) ainsi que les voies de survie cellulaire comme l'autophagie. De manière générale, les voies HIF sont activées au cours d'une phase d'hypoxie tissulaire et provoque l'activation de voies métaboliques de survie cellulaire ; l'autophagie limite les conséquences cellulaires de l'accumulation de la ROS (172).

Cette phase hypoxie prolongée déclenche des signaux inflammatoires locaux, sous forme cytokines pro-inflammatoires, mais aussi de DAMPs (*Danger Associated Molecular Patterns*) diffusés par les hépatocytes, l'endothélium et amplifiée par les cellules de Küpffer et les cellules NK. Les DAMPs, composés de produit de dégradation cellulaire (composés de protéines, de fragments d'ADN...) activent l'immunité innée grâce à son système de récepteur sentinelle les PRR (*pattern recognition receptor*). L'activation des récepteurs PRR conduit à l'expression des molécules d'adhérences à la surface des cellules endothéliales provoquant l'afflux et le recrutement des PNN à la phase de reperfusion (173). Les PNN agissent comme des amplificateurs de la réponse lésionnelle de l'IR et génèrent les lésions de nécrose. La phase de reperfusion provoque une cascade inflammatoire qui s'étend grâce aux cellules de Küpffer puis à l'immunité adaptative. Initialement moins impliquée que l'immunité innée, l'immunité adaptative participe aussi au processus lésionnel. Au cours de la reperfusion, de nombreux lymphocytes TCD4+ afflux et modulent la réponse inflammatoire via des voies de co-stimulations CD28 et CD154 (174). L'implication de ces voies a été mise en exergue grâce à des modèles murins invalidés, souris CD28 KO et CD154 KO, mais aussi grâce à l'utilisation d'anticorps bloquant le CTLA4 (175).

Schéma résumant les mécanismes inflammatoires au cours de l'I/R (d'après *Zhai Y. et al Nat Rev gastroenterology & hepatology* 2012)



Implications cellulaires au cours du processus lésionnel de l'ischémie reperfusion

Atteinte de la microcirculation : plaquettes et cellules endothéliales

Les analyses histologiques des lésions d'I/R identifient des lésions de nécroses, mais aussi des nombreuses atteintes de la microcirculation hépatique. Ces lésions sont aussi aggravées par des processus ischémiques locaux secondaires à la constitution de thrombi plaquettaires au sein d'un endothélium délabré. La souffrance endothéliale survenant dès la phase d'ischémie froide, avec une dysfonction mitochondriale provoquant un swelling et une nécrose des cellules endothéliales génère des produits de dégradation cellulaires qui perturbent la microcirculation (176). Ce stress endothélial, en outre révélé par l'expression membranaire de la P-Selectine, favorise la formation de thrombi (177). L'atteinte endothéliale diminue l'expression membranaire du CD39 dont la fonction physiologique consiste à limiter

l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes ainsi activées influent sur leur environnement via le thromboxane A2 et la sérotonine, aggravant la défaillance micro-circulatoire via leur effet vasoconstricteur. Cette cascade pro-thrombotique est aggravée par l'activation plaquettaire inhibition du plasminogène en interférant sur PAI-1 (Plasminogene Activator Inhibitor -1) (178).

Au cours de l'ischémie froide, en plus de leur impact prothrombotique et sur la dysfonction microcirculatoire, les cellules endothéliales participent aussi au processus lésionnel en facilitant le recrutement de PNN jusqu'au parenchyme hépatique en induisant l'expression à leur membrane des molécules d'adhérences indispensables au « rolling » et à la diapédèse des cellules inflammatoires.

Les hépatocytes :

La dégradation majeure de l'endothélium expose les hépatocytes directement aux cellules inflammatoires et notamment au PNN. Les hépatocytes sont généralement considérés comme des cibles ou des victimes plus que des acteurs du processus lésionnel. Toutefois, il semble que les hépatocytes participent à la propagation du message inflammatoire et au recrutement des PNN. Ce point apparaît notamment dans la capacité d'expression des molécules d'adhérences par les hépatocytes que ce soit ICAM et VCAM au même titre que les cellules endothéliales (179). Les lésions hépatocytaires surviennent principalement à la phase de reperfusion en raison de l'accumulation brutale des ROS (Reactive Oxygen Species)) intra-hépatocytaires et de l'afflux massif de PNN.

Les cellules immunitaires

PNN

Les premières cellules immunitaires impliquées sont les PNN et les macrophages (ou cellules de Küpffer). Si les macrophages participent en qualité de régulateurs de la réponse immunitaire et inflammatoire, les PNN sont les principaux acteurs du processus lésionnel. Les PNN sont rapidement recrutés dans le parenchyme hépatique dès la reperfusion. Des cytokines comme l'IL-8 ou CXCL8 et le CCL2 (CC-chemokine ligand 2 ou MCP-1) les recrutent et les activent. Les PNN activés expriment à leur surface les molécules d'adhérence CD18 et CD11b et CD11a qui forment les hétérodimères Mac-1 (CD11b-CD18) et (LFA-1)(180). Ces hétérodimères se lient aux intégrines exprimés à la surface de la cellule endothéliale et de l'hépatocytes. Ainsi fixés, les PNN peuvent diffuser au cœur du processus lésionnel et phagocyter les cellules lésées.

Cellules de Küpffer

Les cellules de Küpffer sont des macrophages intra-hépatiques qui participent, en situation physiologique, à la tolérance immunologique du foie via la production d'IL-10. Au cours de l'I/R hépatique, elles perdent leur capacité de tolérance immunitaire (181) et amplifient la réponse inflammatoire pour recruter des PNN, mais aussi l'immunité adaptative via la reconnaissance antigénique et le recrutement et l'activation lymphocytaires. Après activation des TLR 3,4 et 9 par les DAMPs (ex : HMGB1), ou les (HSP Heat Shock Protein), les macrophages sécrètent les cytokines pro-inflammatoire TNF, IFN, IL-1 β , IL-6 participant ainsi à l'activation des PNN et de l'expression de Mac1 et LFA1 (182,183).

c. Mécanismes lésionnels

Mécanismes de prévention des lésions d'hypoxie : HIF

Hypoxie provoque l'activation des facteurs de transcriptions les HIF (Hypoxia-Inductible Factor). Ces facteurs de transcriptions, sont des hétérodimères dont la sous unité α est sensible au taux d'oxygène cellulaire. Au cours de l'I/R hépatique, les HIF induisent la transcription de protéines impliquées dans le métabolisme de survie cellulaire notamment en permettant l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme comme Glut-1 (internalisation cellulaire du glucose), PDK-1 (voie AKT, impliquée dans la signalisation cellulaire de l'insuline), cytokine impliquée dans l'angiogenèse NOS, VEGF ou encore Hmax-1 et HSP. L'inactivation génétique de HIF-1 α aggrave les lésions d'ischémie reperfusion. A l'inverse, la voie HIF fournit un rationnel mécanistique aux techniques de conditionnements hépatiques per opératoire par clampage préventif utilisée en chirurgie active la HIF voie, rendant le foie plus résistant à une ischémie prolongée.

Toutefois, malgré l'optimisation de la tolérance cellulaire à l'hypoxie, ischémie prolongée interrompt la chaîne respiratoire mitochondriale, provoquant une majoration du ratio NADH/NAD⁺. La mitochondrie libère en intra cytoplasmique la protéine UCP2 (uncoupling protein 2), entraînant une baisse du gradient de proton dans la mitochondrie brisant la chaîne respiratoire et la production d'ATP. L'épuisement de l'ATP cellulaire puis l'accélération glycolyse et la diminution des stocks énergétiques de la cellule, active le métabolisme cellulaire anaérobie et produit des lactates. L'homéostasie H⁺, Na⁺ et Ca²⁺ est altéré. Les lésions de reperfusion proviennent de l'accumulation essentiellement des ROS suite à la réapparition « brutale » de l'oxygène.

Autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation lysosomale des protéines et organelles endommagées qui peut également servir de voie de survie cellulaire en fournissant l'énergie nécessaire à la cellule. Il semble que l'autophagie soit un mécanisme protecteur des lésions d'ischémie reperfusion, notamment au cours de l'ischémie « chaude ». La formation d'un

autophagosome permet de contrôler la production des ROS. La modulation de l'autophagie influence la sévérité lésionnelle, comme démontré par l'utilisation d'inhibiteur mTOR (Rapamycine). Toutefois, des données contradictoires semblent soulignées qu'une suractivation des mécanismes d'autophagies, en utilisant la protéine LC3-II comme marqueur, soient responsables d'une aggravation des aires de nécrose post I/R hépatique. Mais ces éléments peuvent aussi être interprété à tort, puisque que la nécrose et l'apoptose hépatocytaire est associée à une augmentation de production d'HMGB1, qui se lie à Beclin 1 et active l'autophagie. Cette suractivation de l'autophagie constatée dans les formes les plus sévères pourrait ainsi être secondaire mais dépassée par l'intensité de l'I/R.

Pathogen Recognition Receptor (PRR)

L'activation des récepteurs de l'immunité innée les PRR est très largement impliquée dans la régulation du processus lésionnel de l'I/R. L'activation de ces récepteurs via leurs ligands aggrave significativement les lésions d'I/R. (détaillé précédemment). On distingue quatre classes de PRR, les deux principales étant les TLR (Toll-like receptors) et NLR (NOD-like receptors). [les C-type lectine receptors (CLR) et retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLR) ne seront pas abordés]. Les TLR, au nombre de 13, sont transmembranaires à la surface de la cellule ou du réticulum endoplasmique (pour TLR3,7,8,9). Les NLR sont cytosoliques.

La suite de ce travail se concentre sur le récepteur NLR, NOD1 et son rôle dans le mécanisme d'I/R hépatique.

2. Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 1, acteur et cible de regulation de l'ischémie reperfusion.

a. NOD1 membre de la famille des NLR : Structure et signalisation intracellulaire de NOD1.

Le système immunitaire innée est ubiquitaire, et permet une réponse rapide de l'hôte vis-à-vis d'un pathogène principalement bactérien mais aussi viral. Pour ce faire, le système immunitaire repose sur un système de récepteur à la capacité de reconnaissance et d'identification des PAMPs ou MAMPs (micro-organism ou pathogen associated molecular pattern) appelés PRR (pattern Recognition Receptors) dont les NLR (Nod Like Receptors) sont largement étudiés. NOD1 & NOD2 appartiennent à la famille des NLR et sont des récepteurs cytosoliques. Ils se localisent proche de la membrane cellulaire, généralement au site de pénétration et d'invasion de la bactérie dans la cellule (184). Ils reconnaissent des fragments de parois bactériennes et active des voies de signalisations intracellulaires pro-inflammatoires. NOD1 a été le premier NLR identifié (185,186). Après liaison à un fragment pathogène, NOD1 active des voies de signalisations pro-inflammatoires afin d'induire la réponse immunitaire.

Structurellement, NOD1 possède trois domaines : un domaine caspase (CARD : Caspase Recruitment Domain), un domaine central NBD (Nucleotide Binding Domain) et un domaine fortement enrichi en leucine dit LRR (Leucine Rich-Repeats). Les structures de NOD1 et NOD2 sont représentées ci-après. Chaque fragment possède une fonction spécifique. Le domaine CARD interagit avec RIP2 pour activer la transduction du signal, NBD correspond à une zone d'oligomérisation et de fixation de l'ATP. Enfin, la portion LRR sert à

la reconnaissance des ligands (fragments de paroi des pathogènes). Le LRR de NOD1 reconnaît plus spécifiquement l'acide γ -D-meso-diaminopimelique (ie-DAP), qui correspondant à un composant ou motif commun à de nombreuses bactéries à GRAM négatif ou positif (187,188)

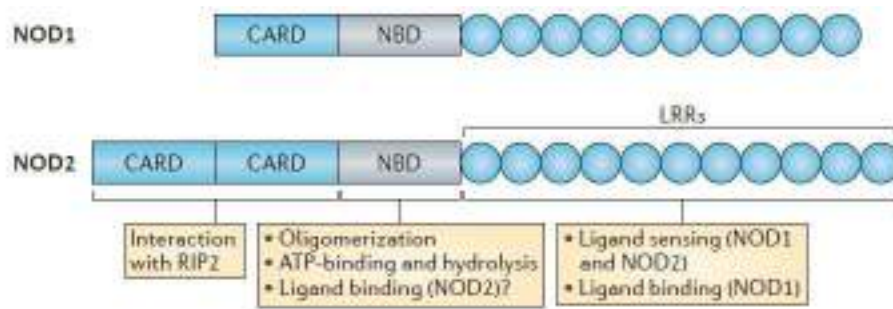


Figure : Représentation schématique de la structure de NOD1 et NOD2. (189)

Le peptidoglycane ou des composés bactériens intracytosoliques dont la présence intracellulaire est favorisée par leurs diffusions transmembranaires grâce aux transporteurs peptidiques comme SLC15A3 ou SLC15A4 (190) active NOD1 via LRR. La reconnaissance par le domaine LRR de son ligand ie-DAP change la conformation protéique facilitant l'oligomérisation via le domaine NBD et l'activation de la kinase RIP2. Cette étape est sous la dépendance de l'ATP, qui vient se lier à la portion NACHT du domaine NBD (191). L'interaction NOD1/RIP2 se produit entre leurs deux motifs CARD de ces protéines et forme un oligomère ou « RIPOsome ». La genèse de ce RIPOsome serait induite par le motif CARD de NOD. Cette étape est essentielle à la transduction du signal intracellulaire. Une mutation génétique sur NOD1 altérant l'oligomérisation de RIP2 a pour conséquence une altération de la réponse immunitaire (192). L'activation de NOD1 et puis de RIP2 est à l'origine de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire tel que le TNF, IFN, IL-12, IL-8, IL-6 ou encore CXCL-1 participant ainsi au recrutement des cellules immunitaires et notamment des PNN (193).

b. La voie de signalisation induite par NOD1.

L'activation de RIP2 et la constitution du RIPosome, secondaire à la formation de l'oligomérisation de NOD1 aboutit au recrutement du complexe formé de TAK1 (TGF β -Activated Kinase 1 aussi dénommé NRC2C), de TAB2 (TAK1-Binding Protein 2) et de TAB3. Ce triple complexe TAK1/TAB2/TAB3 dirige l'activation de la kinase IKK (IkB Kinase), et la phosphorylation, puis la dégradation d'IkB α (NF- κ B Inhibitor α) (189). Le signal intracellulaire de la voie NOD1 n'est pas exclusif de NF- κ B. La voie des MAPK est fortement activée par le récepteur NOD1 notamment via ERK1, ERK2 (extracellular signal-regulated kinase) et JNK conduisant à l'activation des facteurs de transcription c-jun.

De manière intéressante, il semble que NOD1/RIP2 active également BID (BH3-Interacting domain Death agonist) pour interagir avec les complexes IKK. BID inhibe la voie NF- κ B et les voies ERK, mais ne modifie pas celle de p38. Ce recrutement de BID, une protéine de la famille de BCL2 impliquée dans l'apoptose, souligne le lien étroit entre modulation inflammatoire, réponse à l'infection et voie de mort/survie cellulaire (194). De nombreuses études ont révélés le lien ténu entre NOD et l'autophagie. Brièvement, l'autophagie correspond à un instrument de dégradation lysosomale des agents pathogènes participant à la modulation de la réponse immunitaire mais aussi à une voie importante de la survie cellulaire au cours de phase de stress (comme le jeun) en fournissant l'énergie suffisante au fonctionnement cellulaire et des organes, via la dégradation des produits intracellulaire dans l'autophagosome. A l'échelle biochimique intracellulaire, NOD1 (et NOD2) interagit avec ATG16L1 (AuTophagy related protein 16-Like1) (195). L'ATG16L1 initie le processus de l'autophagie via ATG5 et ATG5, pour la transformation du LC3 en LC3-II et la formation intracellulaire de l'autophagosome (196). Le signal et l'activation de

l'autophagie est aussi «up-regulé » par la formation du RIPosome (oligomère RIP2) qui provoque la phosphorylation de ERK, p38 et ULK1. Ces mécanismes sont schématisés dans la figure ci-après (197).

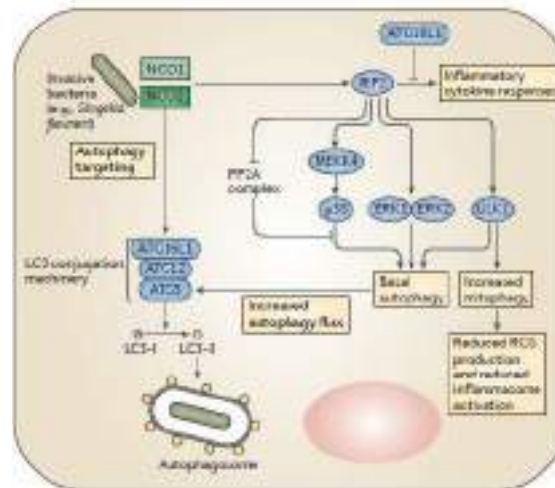


Figure : Lien entre NOD1/NOD2 et autophagie. (Extrait de DJ. Philpott et al, Nature Review Immunology 2014) (189)

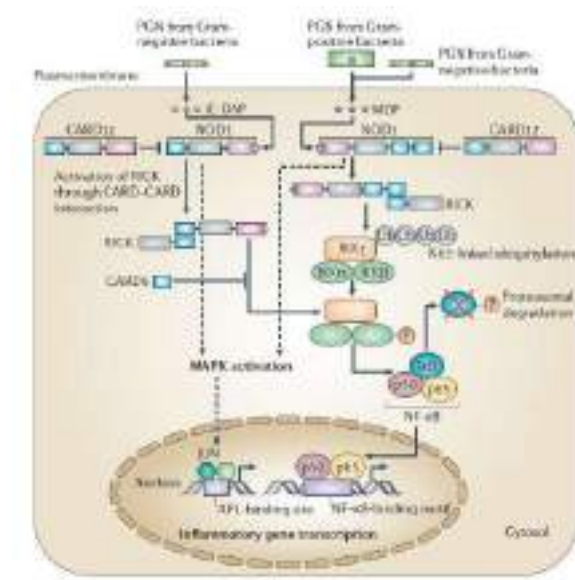


Figure : Voie d'activation intracellulaire de NOD (Strober et al Nat review 2006)(197)

c. Implication de NOD1 dans l'immunité et la défense anti-infectieuse.

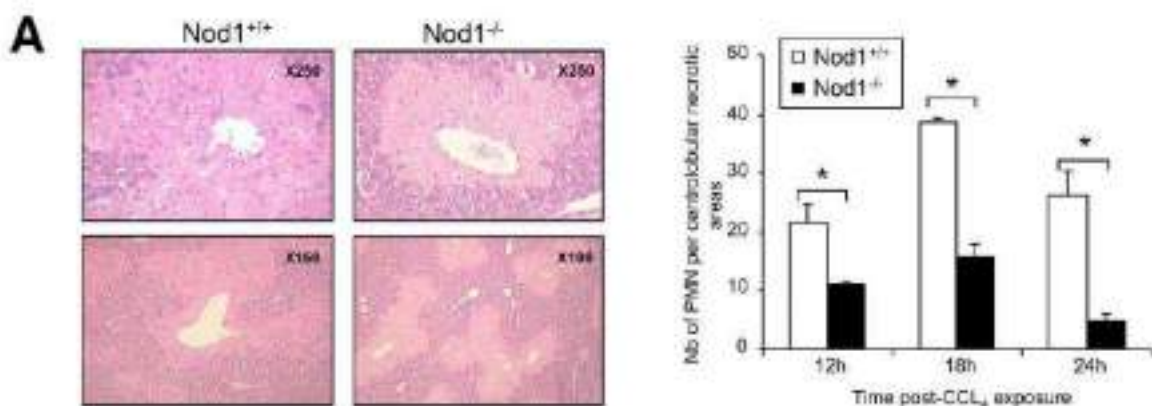
L'activation de la voie NOD1 active NF- κ B et la voie des MAPK permettant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : TNF, IL-6, de cytokine chimio-attractante pour les PNN comme l'IL-8 ou CXCL8, ou les macrophages CXCL2 (MIP2 α) et CCL2 (CC-chemokine ligand 2 ou MCP-1). Grâce à la présence de ces cytokines, PNNs et monocytes vont pouvoir répondre à l'agression des pathogènes. L'activation de NOD1 initie alors la réponse immunitaire antigénique en favorisant la présentation d'antigène grâce au recrutement macrophagique. De manière retardée, l'activation de NOD1 induit aussi la sécrétion de MCP-1/CCL2. En sus de l'activation de l'immunité innée, l'activation de NOD1 permet aussi d'initier la réponse immunitaire adaptative via les lymphocytes Th2, puis de déclencher les réponses Th1 et Th 17 (198). De par son expression ubiquitaire, NOD1 apparaît comme une voie permettant d'engendrer une réponse immunitaire innée et adaptation à partir de cellules non hématopoïétiques (199).

L'implication de la voie NOD1 en réponse à un stimulus de pathogène bactérien, principalement via les voies NF- κ B et MAPK, a été rapporté par de nombreuses études que ce soit *Shigella*, *Helicobacter pylori*, *E. coli* entéro-invasive, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* et des bactéries à Gram positif comme *Clostridium difficile* (189). De manière plus récente, la voie NOD1 est impliquée dans la réponse à des stimuli virologiques, en favorisant la sécrétion d'interférons (IFN) (200–202). Ainsi, NOD1 intervient dans la réponse immune contre le CMV (cytomégalovirus). Son activation diminue la réplication virale, alors que son inhibition via le ML130 ou sa délétion génique dans un modèle murin NOD1^{-/-} favorise la réplication virale du CMV(203).

d. Implication de la voie NOD1 sur la fonction du PNN et conséquences sur l'ischémie-reperfusion hépatique.

A l'échelle du PNN, NOD1 régule l'expression membranaire de la molécule d'adhérence hétérodimérique Mac 1 (CD11b-CD18). Cette dernière se lie aux intégrines et notamment ICAM et VCAM à la surface de l'endothélium. La surexpression membranaire de Mac-1, grâce à un traitement agoniste de NOD1 (FK565 ou ieDAP) augmente l'afflux de PNN sur les sites parenchymateux lésés au décours de l'ischémie reperfusion, amplifiant et aggravant les lésions de nécrose hépatique. A l'inverse l'invalidation génétique de NOD1 réduit exposition à la membrane du CD11b et altère les fonctions du PNN. Les capacités de migration et de phagocytose du PNN sont significativement altérée chez les souris NOD1 KO. En conséquence, l'afflux de PNN dans le parenchyme hépatique lésé diminue de l'ordre de 50%. La tolérance hépatique à l'I/R semble meilleure avec des aires de nécrose hépatiques réduite chez les souris NOD1 KO d'environ 60% (180). L'influence de NOD1 sur les lésions d'I/R est représenté dans la figure ci-dessous.

(D'après Dharancy et al, Gastroenterology 2011)(180)



Toutefois, si le processus lésionnel semble en partie régulé par l'activité des PNN, des données complémentaires sur l'expression hépatique des molécules d'adhérences ICAM,

VCAM, ou encore de P-Selectine soulignent leur rôle crucial dans l'I/R. L'expression hépatocytaire de NOD1 étant très élevée, nous émettons l'hypothèse que NOD1 puisse également avoir un effet régulateur intra-hépatique complémentaire à celui observé dans le PNN.

Etude du rôle hépatique de NOD1 dans la modulation lésionnelle au cours de l'ischémie reperfusion hépatique.

Manuscrit: Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1 (NOD1) Modulates Liver Ischemia Reperfusion Through the Expression Adhesion Molecules.

Auteurs: Lassailly G, Bou Saleh M, Leleu-Chavain N, Ningarhari M, Gantier E, Carpentier R, Artru F, Gnemmi V, Bertin B, Maboudou P, Betbeder D, Gheeraert C, Maggionto F, Dharancy S, Mathurin P, Louvet A, Dubuquoy L.

Le recrutement des PNN dans la zone lésionnelle nécessite l'expression de molécules d'adhérence membranaire de la famille des intégrines comme ICAM-1, VCAM-1 ou des sélectines à la surface de l'endothélium. Si le rôle de NOD1 à l'échelle du PNN semble associé à ses capacités de migration et phagocytose, le rôle de NOD1 dans le foie est inconnu, alors que son expression y est importante.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer le rôle hépatique de NOD1 et de déterminer son rôle au sein de type cellulaire telle que les cellules endothéliales et les hépatocytes.

Méthodes :

Des souris *Nod1*^{-/-} et souris *Nod1*^{+/-} ont été traités avec un agoniste NOD1 (ieDAP,) et soumis à une ischémie hépatique par ligature vasculaire 1h et à une reperfusion de 20h. Les transaminases et la sévérité des lésions hépatiques (aire de nécrose et décompte de l'infiltration des PNN) ont été étudiés dans chaque groupe. L'expression des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) a été analysée sur le foie total et les hépatocytes et cellules endothéliales. L'interaction entre les PNN et les hépatocytes a été étudiée dans un modèle ex-

vivo de co-culture en analysant la concentration des surnageant en LDH et les cellules en microscopie électronique. Enfin, afin de solubiliser l'antagoniste de NOD1, nous avons générer un antagoniste que nous avons intégré à des nanoparticules. Les souris ont alors été traitées par ces nanoparticules. Les aires de nécrose, l'infiltration des PNN et les transaminases ont été analysé chez les souris traités par nanoparticules.

Résultats :

Les agonistes NOD1 aggravent la sévérité des lésions hépatiques, l'infiltration des PNN et augmente l'expression protéique d'ICAM-1 et de VCAM-1 après 20h de reperfusion.

Dans le foie total, en absence d'ischémie reperfusion, le traitement avec les agonistes de NOD1 augmentaient l'expression des molécules d'adhérence, ICAM et VCAM chez les souris sauvages et non chez les souris NOD1^{-/-}. Cette expression était également augmentée dans les cellules endothéliales et dans les hépatocytes. L'expression était sous la dépendance de p38 et de ERK. Dans le modèle de co-culture, le traitement des hépatocytes primaires avec un agoniste NOD1 aggravait les concentrations de LDH dans les surnageant après contact avec des PNN non traités. L'interaction entre les PNN et les hépatocytes primaires était confirmée en microscopie électronique. Le traitement des souris avec un inhibiteur de NOD1, intégré à une nanoparticule l'ALINO 73 (dont l'affinité et le pouvoir inhibiteur a été comparé à l'inhibiteur de référence le ML130) permettaient de réduire la sévérité de lésions d'ischémie reperfusion, les aires de nécrose, l'expression des transaminases, et aussi l'expression d'ICAM.

Conclusion : NOD1 participe à la modulation des lésions hépatiques de l'ischémie reperfusion en modulant l'expression des molécules d'adhérence sur l'endothélium et sur l'hépatocytes.

Partie 6. Discussion.

1. Problématiques générales de la prise en charge de la stéatopathie métabolique.

La problématique de la stéatopathie métabolique symbolise les évolutions de notre société à l'aune de la suralimentation de produits ultra-transformés et de la sédentarité. Aborder sa prise en charge revient à considérer des thématiques de santé publique tel que le diabète de type 2 et l'obésité, dont les assises sont profondément implantées dans le terreau de la précarité sociale et les évolutions de nos modes de vie. La réponse à cette problématique ne peut se trouver exclusivement dans l'allopathie et nécessitera des décisions de politiques sociales, de contrôle de sécurité alimentaire et des actions de santé publique. Sans cette approche globale, les solutions exclusivement thérapeutiques risquent de profiter à des populations socio-économiquement aisées, soucieuses de leur de santé, plutôt qu'à celles où la prévalence de la maladie sera le plus élevée. En conséquence, résumer la prise en charge à une vision thérapeutique renforce les inégalités face à la maladie et aux soins. Les exemples passés fourmillent comme les cancers ORL, le CHC et aussi le cancer du sein. De nombreuses pathologies apportent la preuve que la situation sociale influence non seulement la prévalence mais aussi la survie. En France et de manière plus contrastée aux USA, l'obésité touche les plus précaires. L'obésité dans les premiers âges de la vie, dès la maternelle et l'école primaire peut être perçue comme un facteur influençant le devenir sanitaire des enfants. A l'inverse elle devrait être utilisée pour dépister la malnutrition, la surexposition aux écrans, les risques de décrochages scolaires et la précarisation sociale. Malheureusement, cette utopie se heurte à une réalité analytique plus simpliste qui consiste à culpabiliser dès l'enfance les sujets en surpoids ou obèses en les renvoyant à leur responsabilité de « trop et mal manger ». Cette perception de responsabilité individuelle des patients obèses s'encre profondément dans le

subconscient collectif tant il s'oppose aux conceptions de beauté et de santé, véhiculés par les publicitaires, l'industrie audio-visuelle et cinématographique. En outre, les préjugés sociétaux à leur encontre entrent en résonance avec leur auto-dévalorisation et leur culpabilisation pouvant en partie expliquer les surrisques de dépression et de dépendance des enfants obèses à l'âge adulte. Même les programmes de santé les plus vertueux n'échappent pas à ce préjugé et renforce cette image. A titre d'illustration le programme « *Let's move* » de Michelle Obama, initialement penser pour égaliser l'accès à une alimentation équilibrée dans l'ensemble des cantines des USA, à évoluer vers un programme de lutte contre la sédentarité. Ce qui revient à transformer une action globale et égalitaire à celle d'une responsabilisation individuelle, véhiculant à tort l'idée de choix librement consenti de la sédentarité et de l'obésité. L'OMS tente de changer cette image, en parlant de «maladie» obésité et lui consacre maintenant une journée mondiale le 4 mars. En France, quelques actions publiques vont maintenant en ce sens. A titre d'exemple, le comité supérieur de l'audiovisuelle (CSA) a fait ratifié une charte à l'ensemble des médias accessibles en France : « *l'obésité n'est pas un choix de vie* ». Cette charte s'articule autour de deux axes principaux : ne plus valoriser la maigreur et prendre en compte la diversité des corpulences sans stigmatiser le surpoids. En conclusion, pour être efficace dans le traitement de la stéatopathie métabolique, les politiques d'actions sanitaires devront s'appuyer sur des travaux de réduction des risques en santé publique tout en facilitant l'accès à un traitement médico-chirurgical.

Tout développement thérapeutique pharmacologique ou non s'évalue sur des critères de jugements préalablement définis. Leurs identifications reposent sur leurs performances pronostiques. En absence de critères corrélés avec le risque de décès, la mortalité devient alors le seul critère scientifiquement valable. Les experts internationaux de la NASH ont ainsi choisi des substituts à la mortalité, car trop limitant pour le développement thérapeutique (durée longue et onéreuse des essais, contrainte sur le nombre de traitements évaluables en

phase III ...). La FDA a accepté provisoirement ces critères à condition qu'ils soient validés ultérieurement. Pour le moment la disparition de la NASH sans aggravation de la fibrose ou la diminution de la fibrose sans aggravation de la NASH correspond au critère de jugement des essais de phase III. Mais la pertinence de ce critère biologique et physiopathologique questionne. Biologiquement, la diminution de la fibrose n'est possible qu'à la condition que le mécanisme physiopathologique la générant soit lui-même contrôlé, comme largement démontré dans le traitement des hépatites virales B et C. Cette décision va à l'encontre des critères de phase II, qui s'appuie sur des éléments non invasifs comme la diminution de la stéatose hépatique en IRM. Ce choix des experts confirme le lien entre le contrôle de la NASH/ inflammation et réduction de l'activité de la stéatopathie métabolique symbolisée par l'amélioration de la stéatose. Cette contradiction des critères entre les phases II et III décrédibilise les experts et handicape la recherche d'un traitement efficace pour la NASH.

En effet, le choix de critère non invasif pour les traitements en phase II permet de facilement tester de nombreuses molécules et de les conduire en phase III. Les exemples de traitement efficace sur la stéatose sans effet sur la composante inflammatoire de la NASH sont légions. L'identification de critères de jugements validés et consensuelle s'imposent. En effet, si la stéatose peut être facilement évaluable de manière non invasive, la fibrose peut l'être tout autant grâce à ces très nombreux tests sanguins élastométriques.

L'industrie pharmaceutique cible son développement thérapeutique sur les patients porteurs d'une NASH avec une fibrose avancée pour démontrer la diminution du risque de cirrhose et de mortalité hépatique conférée par leur drogue. Ce choix restreint le développement thérapeutique au risque hépatique et ne considère pas les risques cardiovasculaires ou néoplasiques. Par le passé, les glitazones, dont la rosiglitazone et la pioglitazine ont été associée à une augmentation du risque cardiovasculaire et du risque de néoplasie de vessie. Ces derniers ont alors été retirés du marché par les agences nationales du

médicament (FDA, EMA etc). De plus les événements cardiovasculaires ne semblent pas moins fréquents dans cette population. Considérer des critères de jugements composites intégrant les événements cardiovasculaires et/ou néoplasiques aborderait la problématique de la NASH dans le contexte du syndrome métabolique. C'est cette stratégie qui a permis l'émergence de nouveaux traitements du diabète comme les agonistes GLP-1 avec le liraglutide et les inhibiteurs SGLT2. Le liraglutide, agoniste GLP-1, diminue le poids, améliore le diabète et diminue le risque d'évènement cardiovasculaire. L'empagliflozine, canagliflozine et la danagliflozine, des inhibiteurs SGLT2 ont tous démontré leur effet sur l'amélioration du diabète et la réduction du risque de mortalité cardiovasculaire. De plus, la démonstration a récemment été apporté sur le bénéfice cardiovasculaire y compris chez des patients non diabétiques. Si les critères d'évaluation des autres pathologies métaboliques intègrent les complications du syndrome métabolique dans son ensemble, une réflexion approfondie doit être menée sur leur utilisation en critères composites pour évaluation des traitements de la NASH.

A la recherche d'un traitement efficace de la NASH tout en diminuant les risques cardiovasculaires. La diminution du poids s'accompagne d'une réduction des risques métaboliques, cardiovasculaires et, dans une moindre mesure, néoplasiques. Toutefois, le caractère invasif, les contre-indications somatiques et psychiatriques de la chirurgie restreignent la population potentiellement éligible au traitement et limitent son applicabilité à l'échelle d'une population. L'extension des critères d'éligibilité aux patients avec un IMC entre 30 et 35kg/m², soit une obésité de grade 1, associée à la présence d'une cirrhose ou d'une fibrose extensive associée à une NASH est un premier pas. Cette indication et son applicabilité est étudiée dans l'étude NASHsurg (synopsis et détails du protocole fournis en fin de document).

Les résultats de la chirurgie bariatrique chez l'obèse morbide atteint de NASH, soulignent l'efficacité du traitement avec près de 80% de rémission de la maladie à 1 an, et surtout une absence de récurrence de la NASH entre 1 et 5 ans. Ces résultats modifient le paradigme nosologique et introduisent la notion de traitement durable de la maladie soit la rémission de la NASH. A moyen terme (5 ans) la fibrose disparaît chez près de 45% des patients atteints de fibrose avancée (F3-F4) à baseline. Des données complémentaires sont indispensables en cas de cirrhose compte tenu d'une balance bénéfice risque différente en raison du danger de décompensation hépatique et de mortalité post-opératoire. A l'évidence les données UNOS rapportent une mortalité multipliée par entre 3 et 17 en cas de cirrhose. La cirrhose apparaît comme une contre-indication relative à la chirurgie bariatrique quel qu'en soit le type. La question du choix de la nature de la procédure chirurgicale à pratiquer afin d'obtenir de meilleurs résultats sur la NASH restent partiellement résolus. Les données à 1 et 5 ans semblent en faveur d'une meilleure efficacité du *gatric bypass* comparativement à l'anneau gastrique. La réponse histologique est généralement meilleure que ce soit pour les patients atteints de NASH ou d'une NAFLD « avancée » ($NAS \geq 4$). Ces performances thérapeutiques interrogent sur les possibilités de traiter chirurgicalement des patients avec une maladie grave du foie, c'est-à-dire des patients sur liste de greffe.

Le positionnement de la chirurgie bariatrique se conçoit soit en pré greffe dans un but réduction pondérale chez l'obèse morbide afin de réduire la morbidité per et post opératoire de la TH ; soit en post greffe afin de traiter l'obésité post-greffe qui touche près de 25% des transplantés à 2 ans ou en prévention de la récurrence de la NASH sur le greffon qui peut toucher jusqu'à 50% des patients. La question de la chirurgie préparatoire à la greffe semble illusoire et risquée. Le risque de mortalité post-opératoire chez les sujets avec un MELD supérieur à 11 rend cette hypothèse déraisonnable. On ne peut attendre de la chirurgie bariatrique qu'elle puisse résoudre la problématique de la perte de chance d'accès à la greffe

des sujets obèses morbides. La réponse à cette inégalité ne pourra venir que d'études analysant le rapport volume greffon et IMC chez l'obèse morbide afin de réduire le taux significatif de refus pour « incompatibilité morphologique ». Heimbach et al ont mené une étude exploratoire sur la possibilité de réaliser dans le même temps opératoire une sleeve gastrectomie et une greffe. Cette étude pose les bases du concept du traitement étiologique de la maladie du foie dans le même temps que celui de ces conséquences. Bien que pionnière, on peut toutefois reprocher aux auteurs de ne pas avoir proposés aux patients une stratégie de traitement chirurgicaux séquentiels : TH puis dans un délai ultérieur de quelques mois, une sleeve. Cette option permettrait de réduire la morbidité de la combinaison de deux chirurgies simultanées. Néanmoins, avant de mettre en place ce type de stratégie thérapeutique il conviendra d'évaluer le retentissement et la faisabilité et les risques des différentes chirurgies de l'obésité au décours de la greffe. Parmi les risques, en excluant les risques opératoires, le risque de rejet compte tenu de la malabsorption est à déterminer. De plus, il a été décrit une augmentation du mésusage d'alcool en post chirurgie bariatrique. L'impact chez des patients anciennement alcool-dépendant devra être évalué et suivi attentivement.

La prise en charge de la stéatopathie métabolique et des ces complications dépassent largement le cadre de la thérapeutique et conduit l'hépatologie à prendre le virage évolutif de la prise en charge de la maladie métabolique.

2. Perspectives et application thérapeutique potentielle de la voie NOD1.

A l'instar de TLR4 mais aussi d'autres PRR, NOD1 contribue au processus d'I/R hépatique. NOD1 y participe grâce à son implication dans la fonctionnalité des PNN et à sa capacité de régulation de l'expression des intégrines ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des hépatocytes et des cellules endothéliales. Toutefois de nombreuses questions restent en suspens. Les liens entre NOD1 et voies de survie cellulaire au cours de l'I/R, mais aussi l'interaction entre NOD1 et la voie IL-33 plus spécifiquement dans la fonctionnalité du PNN, nécessitent d'être explorés. Néanmoins, les résultats encourageants obtenus dans la modulation des lésions d'I/R dans des modèles murins incitent à poursuivre le développement thérapeutique des inhibiteurs de NOD1. Avant toute application clinique utilisant un inhibiteur synthétique de NOD1, les risques, notamment, infectieux doivent être appréhendés et anticipés. La cible thérapeutique doit être affiner : utilisation en dehors du foie, comme le rein ou le cœur ? Le rôle de NOD1 dans d'autres situations cliniques comme l'infarctus ou l'AVC. Enfin, si la cible de développement semble être la transplantation, il conviendra de discuter qui traiter du receveur ou du donneur (c'est-à-dire le greffon).

Les résultats prometteurs de la réduction des lésions d'I/R hépatique et l'infiltration des PNN dans les zones lésionnelles de près de 50% incitent à rechercher des mécanismes complémentaires ou synergiques impliquant la voie NOD1 (179,180). Une hypothèse serait l'implication de la voie NOD1 dans l'induction d'interleukines telle que l'IL33. L'activité transcriptionnelle d'IL33 est augmentée via la voie NOD1 (démontré après infection des cellules gastriques par *Helicobacter Pylori*)(204). L'IL33 participe au recrutement des PNN et optimise leur capacité de phagocytose (205). Une atteinte de la voie de l'IL33 est associée à une surmortalité de cause infectieuse dans l'hépatite alcoolique aiguë, mais aussi au cours du

sepsis sévère ou des formes graves de colite à clostridium (206). La régulation du recrutement des PNN et l'implication de la voie NOD1-IL33 dans le contexte de l'I/R hépatique serait une piste d'exploration future dans la compréhension du lien entre NOD1 et PNN. Par ailleurs, de plus en plus d'études établissent un lien entre IL-33, son récepteur ST2, NOD1 et autophagie.

L'autophagie est une voie de survie cellulaire impliquée au cours de l'I/R hépatique. Quelques études, en dehors du contexte d'I/R hépatique, ont souligné le lien entre NOD1 et autophagie. La voie NOD1 active ATG16L1 (195) initiant l'autophagie, par la transformation du LC3 en LC3-II et la formation intracellulaire de l'autophagosome (196). L'étude de la régulation de l'autophagie au moyen d'un inhibiteur NOD1 affinerait la compréhension des mécanismes de régulation lésionnelle induit via la voie NOD1 au-delà de son effet sur l'expression des molécules d'adhérence.

D'autres auteurs se sont intéressés à la voie NOD 1 en dehors foie. Ainsi, plusieurs études font mention de l'implication rénale de NOD1 dans la survenue de la nécrose tubulaire aiguë, mais aussi de dysfonction cardiaque. L'utilisation de ieDAP active Nf- κ B et la synthèse du TGF β et provoque l'apoptose (207,208). La voie NOD1 semble aussi fortement impliquée dans les processus de fibrogenèse cardiaque. Au niveau cérébral, l'activation de NOD1 majorant les lésions d'AVC ischémique via TAK1 qui est une des cibles de NOD1/RIP2 et via CARD3 (209). Toutefois, les inhibiteurs de NOD1 n'ont pas encore été évalué dans un objectif de modulation des processus ischémiques cérébraux ou cardiaques.

A l'échelle hépatique, les résultats sur l'utilisation des inhibiteurs NOD1 (ML130 et ALINO) intégrés à une nanoparticule pour faciliter leur internalisation et leur diffusion suggèrent qu'ils puissent être évalués sur foie stéatosique. Les lésions I/R hépatiques y sont significativement plus importantes, rendant les foies stéatosiques non utilisables pour la greffe. Un traitement permettant d'augmenter le pool de greffons utilisables diminuerait la

mortalité sur liste d'attente hépatique, actuellement de 15%. Si de tels inhibiteurs émergent, il faudra définir la cible thérapeutique optimale entre le donneur et le receveur.

En effet, NOD1 participe au mécanisme de défense de l'hôte contre de nombreux pathogène. Le traitement du receveur majorait potentiellement ce risque d'autant plus que la ciclosporine, traitement immunosuppresseur historique de la famille des anticalcineurines, réduit les capacités de phagocytes du PNN en interagissant, entre autres, avec la voie NOD1 (210). L'utilisation d'inhibiteur NOD1 à la phase immédiate post transplantation majorait ainsi potentiellement le risque infectieux. D'autres pathogènes et infections sont alors à risque, puisse que NOD1 est impliqué dans les infections pulmonaires et digestives (campylobacter, shigella ou encore le clostridium difficile). Par ailleurs, la réponse immunitaire à la tuberculose, considérée comme une infection opportuniste à rechercher chez le patient greffé, implique NOD1 (211).

Si le traitement du receveur semble périlleux et à haut risque infectieux, le traitement du greffon avant implantation, soit chez le donneur, soit avant implantation sur machine de perfusion réduirait hypothétiquement le risque septique. Le traitement du foie contribuerait à restreindre l'expression des molécules d'adhérence et les lésions de reperfusion. Néanmoins, NOD1 est aussi impliquée dans la lutte contre à l'infection à CMV (203), responsable de complication grave et létale en cas de maladie à CMV en post greffe. Une des formes les plus à risque correspond à la réactivation du CMV du greffon chez un receveur non-immunisé. Un traitement pré-implantatoire imposerait de surveiller cette éventualité et de mettre en place un traitement prophylactique antiviral par ganciclovir ou valganciclovir.

Conclusion

La stéatopathie métabolique a rapidement émergé depuis les années 1980 et à évoluer d'une maladie anecdotique à celle responsable d'un enjeu de santé publique mondiale. Elle reflète les excès de notre mode vie moderne et fait partie de la sphère des complications métaboliques altérant la qualité et l'espérance de vie. La stéatopathie s'impose comme la maladie du foie la plus fréquente dans le monde et une des principales causes de greffe.

Des nombreuses options thérapeutiques sont en cours de développement et d'évaluation allant de stratégies nutritionnelles, médicamenteuses et chirurgicales. Ces stratégies ne seront applicables et pertinentes que si elles sont mises en œuvre dans le cadre d'une politique de globale de santé publique.

Compte tenu de retentissement de la stéatopathie métabolique et de l'obésité dans la population, des stratégies de gestion des complications en rapport avec l'utilisation de greffons marginaux stéatosiques en transplantation hépatique s'avère nécessaire. La régulation du processus lésionnel de l'ischémie reperfusion hépatique via le récepteur de l'immunité innée NOD1 et l'utilisation d'inhibiteur NOD1 semble une option thérapeutique prometteuse.

Références

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. In: *Mayo Clinic Proceedings*. 1980. p. 434–438.
2. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. juin 2012;142(7):1592-609.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
4. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11.
5. Liver EA for TS of T, Diabetes (EASD EA for the S of. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Facts*. 2016;9(2):65–90.
6. Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113–121.
7. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Ståhl P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547–1554.
8. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389–397.
9. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(9):2467–2474.
10. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321.
11. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1081–1090.
12. Fracanzani AL, Valenti L, Russello M, Miele L, Bertelli C, Bellia A, et al. Gallstone disease is associated with more severe liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e41183.
13. Kim Y-K, Kwon O-S, Her KH. The grade of nonalcoholic fatty liver disease is an independent risk factor for gallstone disease: An observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(27).
14. Fishbein M, Castro F, Cheruku S, Jain S, Webb B, Gleason T, et al. Hepatic MRI for fat quantitation: its relationship to fat morphology, diagnosis, and ultrasound. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(7):619–625.

15. 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(3):745–750.
16. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344–353.
17. Caussy C, Alquraish MH, Nguyen P, Hernandez C, Cepin S, Fortney LE, et al. Optimal threshold of controlled attenuation parameter with MRI-PDFF as the gold standard for the detection of hepatic steatosis. *Hepatology*. 2018;67(4):1348–1359.
18. Caussy C, Reeder SB, Sirlin CB, Loomba R. Noninvasive, quantitative assessment of liver fat by MRI-PDFF as an endpoint in NASH trials. *Hepatology*. 2018;68(2):763–772.
19. Park CC, Nguyen P, Hernandez C, Bettencourt R, Ramirez K, Fortney L, et al. Magnetic resonance elastography vs transient elastography in detection of fibrosis and noninvasive measurement of steatosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2017;152(3):598–607.
20. Loomba R, Sirlin CB, Ang B, Bettencourt R, Jain R, Salotti J, et al. Ezetimibe for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: assessment by novel magnetic resonance imaging and magnetic resonance elastography in a randomized trial (MOZART trial). *Hepatology*. 2015;61(4):1239–1250.
21. Bedossa P, Consortium FP. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565–575.
22. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot J-L, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751–1759.
23. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA, Network (CRN) NCR. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53(3):810–820.
24. Younossi Z, Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1778–1785.
25. Caruso MG, Veronese N, Notarnicola M, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, et al. Fatty liver and mortality: a cohort population study in South Italy. *BMJ Open*. 2019;9(6):e027379.
26. Olubamwo OO, Virtanen JK, Pihlajamäki J, Tuomainen T-P. Association of fatty liver disease with mortality outcomes in an Eastern Finland male cohort. *BMJ Open Gastroenterol*. 2019;6(1):e000219.
27. Vilar-Gomez E, Chalasani N. Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *J Hepatol*. 2018;68(2):305–15.
28. Nabi O, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study. *Gastroenterology*. 2020;159(2):791–793.e2.
29. Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, Buob D, Leteurtre E, Arnalsteen L, 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(6):499–506.
30. Munteanu M, Tiniakos D, Anstee Q, Charlotte F, Marchesini G, Bugianesi E, et al. Diagnostic performance of FibroTest, SteatoTest and ActiTest in patients with NAFLD using the SAF score as histological reference. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;44(8):877–89.

31. Guiu B, Crevisy-Girod E, Binquet C, Duvillard L, Masson D, Lepage C, et al. Prediction for steatosis in type-2 diabetes: clinico-biological markers versus 1H-MR spectroscopy. *Eur Radiol.* avr 2012;22(4):855-63.
32. Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology* Baltim Md. sept 2005;42(3):650-6.
33. Vilar-Gomez E, Yasells-Garcia A, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, et al. Development and validation of a noninvasive prediction model for nonalcoholic steatohepatitis resolution after lifestyle intervention. *Hepatology* Baltim Md. 2016;63(6):1875-87.
34. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* Baltim Md. sept 2008;48(3):792-8.
35. Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Komorowski R, Wallace J, Surapaneni SN, Franco J, et al. A noninvasive clinical scoring model predicts risk of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg.* juin 2010;20(6):685-91.
36. Pearce SG, Thosani NC, Pan J-J. Noninvasive biomarkers for the diagnosis of steatohepatitis and advanced fibrosis in NAFLD. *Biomark Res.* 2013;1(1):7.
37. Harrison SA, Ratziu V, Boursier J, Francque S, Bedossa P, Majd Z, et al. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;
38. Boursier J, Guillaume M, Leroy V, Irlès M, Roux M, Lannes A, et al. New sequential combinations of non-invasive fibrosis tests provide an accurate diagnosis of advanced fibrosis in NAFLD. *J Hepatol.* 2019;71(2):389–396.
39. Boursier J, Francque S. Noninvasive Tests of Liver Fibrosis and Their Combination in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Selected Patients to Real-Life Populations. *Hepatology.* 2019;70(5):1500–1502.
40. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology.* 2015;148(3):547–555.
41. Li J, Zou B, Yeo YH, Feng Y, Xie X, Lee DH, et al. Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999–2019: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019;4(5):389–398.
42. Allen AM, Therneau TM, Larson JJ, Coward A, Somers VK, Kamath PS. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: a 20 year-community study. *Hepatology.* 2018;67(5):1726–1736.
43. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis. *J Hepatol.* 2016;65(3):589–600.
44. Ma J, Hwang S-J, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol.* 2017;66(2):390–397.
45. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology.* 2018;67(1):123–133.
46. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology.* 2009;49(3):851–859.

47. Frith J, Day CP, Henderson E, Burt AD, Newton JL. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*. 2009;55(6):607–613.
48. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461–1465.
49. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet*. 2014;23(15):4077–4085.
50. Pingitore P, Pirazzi C, Mancina RM, Motta BM, Indiveri C, Pujia A, et al. Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841(4):574–580.
51. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*. 2017;66(4):1111–1124.
52. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1219–1230.
53. Lee H-C, Inoue T, Imae R, Kono N, Shirae S, Matsuda S, et al. Caenorhabditis elegans mboa-7, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):1174–1184.
54. Pommery J, Pommery N, Hénichart J-P. Modification of eicosanoid profile in human blood treated by dual COX/LOX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(6):411–417.
55. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352–356.
56. Liu Y-L, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JB, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*. 2014;5(1):1–6.
57. Fan Y, Lu H, Guo Y, Zhu T, Garcia-Barrio MT, Jiang Z, et al. Hepatic transmembrane 6 superfamily member 2 regulates cholesterol metabolism in mice. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1208–1218.
58. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase, and incident diabetes: the British Women’s Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2009;32(4):741–750.
59. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019;71(4):793–801.
60. Faucher P, Poitou C. Physiopathologie de l’obésité. *Rev Rhum Monogr*. 2016;83(1):6–12.
61. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1138–1145.
62. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*. 2011;378(9793):804–814.
63. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *The Lancet*. 2011;378(9793):815–825.

64. Swinburn BA. Obesity prevention: the role of policies, laws and regulations. *Aust N Z Health Policy*. 2008;5(1).
65. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2211–2219.
66. Global BMI. Mortality Collaboration null, Di Angelantonio E, Bhupathiraju S, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet*. 2016;388:776–786.
67. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet*. 2014;384(9945):766–781.
68. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010. *Jama*. 2012;307(5):491–497.
69. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *Jama*. 2010;303(3):235–241.
70. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999–2010. *Jama*. 2012;307(5):483–490.
71. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413–1419.
72. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865–873.
73. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1341–1350.
74. Lin Y-C, Lo H-M, Chen J-D. Sonographic fatty liver, overweight and ischemic heart disease. *World J Gastroenterol WJG*. 2005;11(31):4838.
75. Alexander M, Loomis AK, van der Lei J, Duarte-Salles T, Prieto-Alhambra D, Ansell D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident acute myocardial infarction and stroke: findings from matched cohort study of 18 million European adults. *bmj*. 2019;367:l5367.
76. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;49(4):608–612.
77. 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.
78. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*. 1990;11(1):74–80.
79. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*. 1995;22(6):1714–1719.
80. Pais R, Pascale A, Fedchuck L, Charlotte F, Poynard T, Ratziu V. Progression from isolated steatosis to steatohepatitis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 1 janv 2011;35(1):23–8.
81. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 1 sept 2013;59(3):550–6.

82. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* 2015;62(5):1148–1155.
83. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(4):643–654.
84. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2009;51(2):371–379.
85. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1999;30(6):1356–1362.
86. Hui JM, Kench JG, Chitturi S, Sud A, Farrell GC, Byth K, et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38(2):420–427.
87. Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology.* 2006;43(4):682–689.
88. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D, Lee E, Hui JM, Saracco G, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology.* 2011;54(4):1208–1216.
89. White DL, Thrift AP, Kanwal F, Davila J, El-Serag HB. Incidence of hepatocellular carcinoma in all 50 United States, from 2000 through 2012. *Gastroenterology.* 2017;152(4):812–820.
90. White DL, Kanwal F, El-Serag HB. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(12):1342–1359.
91. Wong RJ, Cheung R, Ahmed A. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology.* 2014;59(6):2188-95.
92. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, Pecorelli A, Marinelli S, Tiribelli C, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology.* 2016;63(3):827-38.
93. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut.* 1 avr 2005;54(4):533-9.
94. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med.* 24 avr 2003;348(17):1625-38.
95. Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. *Gut.* 2011;60(1):85–89.
96. Chang CY, Hernandez-Prera JC, Roayaie S, Schwartz M, Thung SN. Changing epidemiology of hepatocellular adenoma in the United States: review of the literature. *Int J Hepatol.* 2013;2013.
97. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus: prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med.* 1993;329(27):1988–1992.
98. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(1):31.

99. Desbuquois B, Carré N, Burnol A-F. Regulation of insulin and type 1 insulin-like growth factor signaling and action by the Grb10/14 and SH2B1/B2 adaptor proteins. *FEBS J*. 2013;280(3):794–816.
100. Hubbard SR. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):a008946.
101. Sylow L, Kleinert M, Pehmøller C, Prats C, Chiu TT, Klip A, et al. Akt and Rac1 signaling are jointly required for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and downregulated in insulin resistance. *Cell Signal*. 2014;26(2):323–331.
102. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(6):383–396.
103. Cohen P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(11):867–873.
104. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133–2223.
105. Cherrington AD, Edgerton D, Sindelar DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*. 1998;41(9):987–996.
106. Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J Clin Invest*. 2006;116(1):101–114.
107. Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S, et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med*. 2012;18(3):388–395.
108. Jelenik T, Kaul K, Séquaris G, Flögel U, Phielix E, Kotzka J, et al. Mechanisms of insulin resistance in primary and secondary nonalcoholic fatty liver. *Diabetes*. 2017;66(8):2241–2253.
109. Eaton RP, Berman M, Steinberg D. Kinetic studies of plasma free fatty acid and triglyceride metabolism in man. *J Clin Invest*. 1969;48(8):1560–1579.
110. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(6):1120–1124.
111. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2(4):282–286.
112. Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell*. 2002;2(4):477–488.
113. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999;103(2):253–259.
114. Shulman GI. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med*. 2014;371(12):1131–1141.
115. Le Marchand-Brustel Y, Grémeaux T, Ballotti R, Van Obberghen E. Insulin receptor tyrosine kinase is defective in skeletal muscle of insulin-resistant obese mice. *Nature*. 1985;315(6021):676–679.
116. Ploug T, Van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J Cell Biol*. 1998;142(6):1429–1446.
117. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):85–96.
118. Kruszynska YT, Home PD. Liver and muscle insulin sensitivity, glycogen concentration and glycogen synthase activity in a rat model of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*. 1988;31(5):304–309.

119. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726–735.
120. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016;63(3):764–775.
121. Burguera B, Couce ME, Curran GL, Jensen MD, Lloyd RV, Cleary MP, et al. Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes*. 2000;49(7):1219–1223.
122. Hackl MT, Fürnsinn C, Schuh CM, Krssak M, Carli F, Guerra S, et al. Brain leptin reduces liver lipids by increasing hepatic triglyceride secretion and lowering lipogenesis. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–13.
123. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(36):15430–15435.
124. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 sept 2011;108(39):16381–5.
125. Cantley JL, Yoshimura T, Camporez JPG, Zhang D, Jornayvaz FR, Kumashiro N, et al. CGI-58 knockdown sequesters diacylglycerols in lipid droplets/ER-preventing diacylglycerol-mediated hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(5):1869–1874.
126. Magkos F, Su X, Bradley D, Fabbrini E, Conte C, Eagon JC, et al. Intrahepatic diacylglycerol content is associated with hepatic insulin resistance in obese subjects. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1444–1446.
127. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 5 juin 2014;510(7503):84–91.
128. Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, Leivonen M, Arola J, Orešič M, et al. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(5):1167–1175.
129. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. août 2015;149(2):367–378.e5; quiz e14–15.
130. Lassaïly G, Caiazzo R, Pattou F, Mathurin P. Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 1 juin 2016;150(8):1835–48.
131. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, Abdelmalek MF, Aithal GP, Caballeria J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. 2018;67(5):1754–67.
132. Harrison SA, Wong VW-S, Okanoue T, Bzowej N, Vuppalanchi R, Younes Z, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: results from randomized Ph III S^{TELL}AR trials. *J Hepatol*. 2020;
133. Traussnigg S, Schattenberg JM, Demir M, Wiegand J, Geier A, Teuber G, et al. Norursodeoxycholic acid versus placebo in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 dose-finding trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019;4(10):781–793.
134. Verbeke L, Farre R, Trebicka J, Komuta M, Roskams T, Klein S, et al. Obeticholic acid, a farnesoid X receptor agonist, improves portal hypertension by two distinct pathways in cirrhotic rats. *Hepatol Baltim Md*. juin 2014;59(6):2286–98.

135. Goto T, Itoh M, Suganami T, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, et al. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 25 mai 2018;8(1):8157.
136. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet.* 14 mars 2015;385(9972):956-65.
137. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet.* 2019;394(10215):2184–2196.
138. Dolegowska K, Marchelek-Mysliwiec M, Nowosiad-Magda M, Slawinski M, Dolegowska B. FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21. *J Physiol Biochem.* 2019;1–12.
139. Knott ME, Minatta JN, Roulet L, Gueglio G, Pasik L, Ranuncolo SM, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 (Fgf21) as diagnostic and prognostic biomarker in renal cancer. *J Mol Biomark Diagn.* 2016;1(Suppl 2).
140. Knott ME, Ranuncolo SM, Nuñez M, Armanasco E, Puricelli LI, De Lorenzo MS. Levels of Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in serum as diagnostic biomarker in patients with breast cancer. *AACR*; 2015.
141. Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Pablo Frias J, Kundu S, Luo Y, Tirucherai GS, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), PEGylated FGF21, in patients with obesity and type 2 diabetes: results from a randomized phase 2 study. *Obesity.* 2019;27(1):41–49.
142. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet.* 2018;392(10165):2705–2717.
143. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, Trotter JF, Paredes AH, Arnold HL, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet.* 2018;391(10126):1174–1185.
144. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, Zhou R, Moylan CA, Frias JP, et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet.* 2019;394(10213):2012–2024.
145. Chalasani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhoury N, Rinella M, et al. Effects of belaepectin, an inhibitor of galectin-3, in patients with nonalcoholic steatohepatitis with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology.* 2020;158(5):1334–1345.
146. Chang S-H, Stoll CRT, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg.* mars 2014;149(3):275-87.
147. Sjöström L, Gummesson A, Sjöström CD, Narbro K, Peltonen M, Wedel H, et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol.* juill 2009;10(7):653-62.
148. Batsis JA, Sarr MG, Collazo-Clavell ML, Thomas RJ, Romero-Corral A, Somers VK, et al. Cardiovascular risk after bariatric surgery for obesity. *Am J Cardiol.* 2008;102(7):930–937.
149. Sjöström L, Peltonen M, Jacobson P, Sjöström CD, Karason K, Wedel H, et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *Jama.* 2012;307(1):56–65.

150. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Leccesi L, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 26 avr 2012;366(17):1577-85.
151. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med.* 22 mai 2014;370(21):2002-13.
152. Hocking MP, Duerson MC, O'Leary JP, Woodward ER. Jejunoileal bypass for morbid obesity: late follow-up in 100 cases. *N Engl J Med.* 1983;308(17):995-999.
153. Keleidari B, Mahmoudieh M, Gorgi K, Sheikhabaehi E, Shahabi S. Hepatic Failure After Bariatric Surgery: A Systematic Review. *Hepat Mon.* 2019;19(1).
154. Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, Leteurtre E, Arnalsteen L, Hollebecque A, et al. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology.* 2006;130(6):1617-1624.
155. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology.* août 2009;137(2):532-40.
156. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology.* 2004;39(6):1647-1654.
157. Group UMFLS. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(17):1110-1115.
158. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, et al. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl.* 2003;9(12):1231-1243.
159. Parikh ND, Marrero WJ, Wang J, Steuer J, Tapper EB, Konerman M, et al. Projected increase in obesity and non-alcoholic-steatohepatitis-related liver transplantation waitlist additions in the United States. *Hepatology.* 2019;70(2):487-495.
160. Spengler EK, O'Leary JG, Te HS, Rogal S, Pillai AA, Al-Osaimi A, et al. Liver transplantation in the obese cirrhotic patient. *Transplantation.* 2017;101(10):2288.
161. Pelletier SJ, Schaubel DE, Wei G, Englesbe MJ, Punch JD, Wolfe RA, et al. Effect of body mass index on the survival benefit of liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007;13(12):1678-1683.
162. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA, et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006;6(4):783-790.
163. McCormack L, Dutkowski P, El-Badry AM, Clavien P-A. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol.* 2011;54(5):1055-1062.
164. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien P-A, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008;14(12):1694-1707.
165. Ploeg RJ, D'alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation.* 1993;55(4):807-813.
166. Laing RW, Mergental H, Yap C, Kirkham A, Whilku M, Barton D, et al. Viability testing and transplantation of marginal livers (VITTAL) using normothermic machine perfusion: study protocol for an open-label, non-randomised, prospective, single-arm trial. *BMJ Open.* 2017;7(11).
167. Gehrau RC, Mas VR, Dumur CI, Suh JL, Sharma AK, Cathro HP, et al. Donor hepatic steatosis induce exacerbated ischemia-reperfusion injury through activation of innate immune response molecular pathways. *Transplantation.* 2015;99(12):2523.

168. Selzner M, RüDiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien P-A. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*. 2000;32(6):1280–1288.
169. Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, Degenshein GA, Kozinn PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*. 1977;72(6):1268–1270.
170. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*. 1994;145(6):1421.
171. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia–reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(2):79–89.
172. Elias-Miro M, Jimenez-Castro MB, Rodes J, Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res*. 2013;47(8):555–568.
173. Lu L, Zhou H, Ni M, Wang X, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J, et al. Innate immune regulations and liver ischemia reperfusion injury. *Transplantation*. 2016;100(12):2601.
174. Caldwell CC, Tschoep J, Lentsch AB. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Leukoc Biol*. 2007;82(3):457–464.
175. Najafian N, Sayegh MH. CTLA4-Ig: a novel immunosuppressive agent. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(9):2147–2157.
176. Upadhyya GA, Topp SA, Hotchkiss RS, Anagli J, Strasberg SM. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 2003;37(2):313–323.
177. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien P-A. P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology*. 1999;29(5):1494–1502.
178. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien P-A. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology*. 2000;118(1):183–191.
179. Lassailly G, Saleh MB, Leleu-Chavain N, Ningarhari M, Gantier É, Carpentier R, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) modulates liver ischemia reperfusion through the expression adhesion molecules. *J Hepatol*. 2019;70(6):1159–1169.
180. Dharancy S, Body–Malapel M, Louvet A, Berrebi D, Gantier E, Gosset P, et al. Neutrophil migration during liver injury is under nucleotide-binding oligomerization domain 1 control. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1546–1556.
181. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology*. 2015;62(1):279–291.
182. Toki Y, Takenouchi T, Harada H, Tanuma S, Kitani H, Kojima S, et al. Extracellular ATP induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1 β , HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(4):771–776.
183. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor- α contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol*. 1994;55(1):105–111.
184. Kufer TA, Kremmer E, Adam AC, Philpott DJ, Sansonetti PJ. The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol*. 2008;10(2):477–486.
185. Bertin J, Nir W-J, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B. *J Biol Chem*. 1999;274(19):12955–12958.

186. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B. *J Biol Chem*. 1999;274(21):14560–14567.
187. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 2003;4(7):702–707.
188. Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park J-H, Kim Y-G, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29054–29063.
189. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):9–23.
190. Irving AT, Mimuro H, Kufer TA, Lo C, Wheeler R, Turner LJ, et al. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host Microbe*. 2014;15(5):623–635.
191. Zurek B, Proell M, Wagner RN, Schwarzenbacher R, Kufer TA. Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation. *Innate Immun*. 2012;18(1):100–111.
192. Gong Q, Long Z, Zhong FL, Teo DET, Jin Y, Yin Z, et al. Structural basis of RIP2 activation and signaling. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–13.
193. Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S, et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(1):203–213.
194. Yeretssian G, Correa RG, Doiron K, Fitzgerald P, Dillon CP, Green DR, et al. Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature*. 2011;474(7349):96–99.
195. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010;11(1):55–62.
196. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):2092–2100.
197. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(1):9–20.
198. Kasimsetty SG, Shigeoka AA, Scheinok AA, Gavin AL, Ulevitch RJ, McKay DB. Lack of Both Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Proteins 1 and 2 Primes T Cells for Activation-Induced Cell Death. *J Immunol*. 2017;199(3):1196–1205.
199. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007;26(4):445–459.
200. Kanneganti T-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(10):688–698.
201. Watanabe T, Asano N, Kitani A, Fuss IJ, Chiba T, Strober W. Activation of type I IFN signaling by NOD1 mediates mucosal host defense against *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes*. 2011;2(1):61–65.
202. Herskovits AA, Auerbuch V, Portnoy DA. Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS Pathog*. 2007;3(3):e51.
203. Fan Y-H, Roy S, Mukhopadhyay R, Kapoor A, Duggal P, Wojcik GL, et al. Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) and its variants in human cytomegalovirus control in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(48):E7818–E7827.

204. Tran LS, Tran D, De Paoli A, D'Costa K, Creed SJ, Ng GZ, et al. NOD1 is required for *Helicobacter pylori* induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2018;20(5):e12826.
205. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010;16(6):708–712.
206. Artru F, Saleh MB, Maggiotto F, Lassailly G, Ningarhari M, Demaret J, et al. IL-33/ST2 pathway regulates neutrophil migration and predicts outcome in patients with severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol.* 2020;
207. Dueker ND, Beecham A, Wang L, Blanton SH, Guo S, Rundek T, et al. Rare variants in NOD1 associated with carotid bifurcation intima-media thickness in Dominican Republic families. *PloS One.* 2016;11(12):e0167202.
208. Fernández-Velasco M, Prieto P, Terrón V, Benito G, Flores JM, Delgado C, et al. NOD1 activation induces cardiac dysfunction and modulates cardiac fibrosis and cardiomyocyte apoptosis. *PloS One.* 2012;7(9):e45260.
209. Wu X, Lin L, Qin J-J, Wang L, Wang H, Zou Y, et al. CARD3 Promotes Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Via Activation of TAK1. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(9):e014920.
210. Tourneur E, Mkaddem SB, Chassin C, Bens M, Goujon J-M, Charles N, et al. Cyclosporine A impairs nucleotide binding oligomerization domain (Nod1)-mediated innate antibacterial renal defenses in mice and human transplant recipients. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):e1003152.
211. Lee J-Y, Hwang E-H, Kim D-J, Oh S-M, Lee K-B, Shin SJ, et al. The role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 during cytokine production by macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunobiology.* 2016;221(1):70–75.

Références des articles publiés :

Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis.

Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji LC, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, Ningarhari M, Louvet A, Leteurre E, Raverdy V, Dharancy S, Pattou F, Mathurin P. *Gastroenterology*. 2020 Oct;159(4):1290-1301.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.006. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32553765

Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients.

Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, Raverdy V, Leteurre E, Dharancy S, Louvet A, Romon M, Duhamel A, Pattou F, Mathurin P. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):379-88; quiz e15-6. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.014. Epub 2015 Apr 25. PMID: 25917783

Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis.

Lassailly G, Caiazzo R, Pattou F, Mathurin P. *Gastroenterology*. 2016 Jun;150(8):1835-48. doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.004. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26971824

Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) modulates liver ischemia reperfusion through the expression adhesion molecules.

Lassailly G, Bou Saleh M, Leleu-Chavain N, Ningarhari M, Gantier E, Carpentier R, Artru F, Gnemmi V, Bertin B, Maboudou P, Betbeder D, Gheeraert C, Maggioro F, Dharancy S, Mathurin P, Louvet A, Dubuquoy L. *J Hepatol*. 2019 Jun;70(6):1159-1169. doi: 10.1016/j.jhep.2019.01.019. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30685324

Article en cours de publication (soumission) au moment de la diffusion : *Severe obesity increases death and dropout from the liver waiting list*

A randomized controlled study evaluating bariatric surgery as a treatment for severe NASH with advanced liver fibrosis in non-severe obese patients

NASHsurg Study

Coordinating Investigator Pr Philippe Mathurin
Hôpital HURIEZ, Service des maladies de l'appareil digestif
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tél : 03 20 44 53 21
Mail : philippe.mathurin@chru-lille.fr

Co-investigator Dr Guillaume Lassailly
Hôpital HURIEZ, Service des maladies de l'appareil digestif
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tél : 03 20 44 53 21
Mail : guillaume.lassailly@chru-lille.fr

Sponsor University Hospital of Lille
Département de la recherche en santé
2 avenue Oscar Lambret
59037 LILLE Cedex
tél : 03 20 44 59 69

Sponsor code 2018

EudraCT Number / ID RCB

Version N°1.0 **Date** : 11/09/2017

Expertized by the Fédération de Recherche Clinique - University Hospital of Lille

DATES ET SIGNATURES

COORDINATING INVESTIGATOR SIGNATURE

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Coordinating Investigator | |
| Name, first name : MATHURIN Philippe | Date : 22/07/2016 |
| Signature : | |

SPONSOR SIGNATURE

| | |
|------------------------|--------|
| Sponsor Representative | |
| Name, first name : | Date : |
| Signature : | |

INVESTIGATIONAL SITES

| Center number | Center Name | Principal Investigator | Surgeon Investigator |
|---------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | CHRU de Lille | Pr Philippe Mathurin | Pr François Pattou |
| 2 | CHU de Bondy | Pr Nathalie Carrié-Ganne | Pr Christophe Barrat |
| 3 | CHU de Nice | Dr Rodolphe Anty | Pr Antonio Iannelli |
| 4 | CHU d'Angers | Pr Jérôme Boursier | Dr Jean-Baptiste Finel |
| 5 | CHU de Toulouse | Dr Maeva Guillaume | Dr Mael Chalret du Rieu |
| 6 | CHU de Montpellier | Dr Stéphanie Faure | Pr David Nocca |
| 7 | CHU de Caen | Pr Marie-Astride Piquet | Dr Yannick Le Roux |

MEDICAL AND SCIENTIFIC COLLABORATION

Medical Contributor

Pr François Pattou

Hôpital HURIEZ, Service de chirurgie digestive et endocrinienne
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tél : 03 20 44 53 21
f.pattou@univ-lille2.fr

Dr Viviane Gnemmi

Centre de Biologie et Pathologie, Service d'anatomopathologie
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tel : 03 20 44 53 21
viviane.gnemmi@chru-lille.fr

Dr Hélène Verkindt

Hôpital HURIEZ, Service de chirurgie digestive et endocrinienne
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tél : 03 20 44 53 21
helene.verkindt@chru-lille.fr

Pr Robert Caiazzo

Hôpital HURIEZ, Service de chirurgie digestive et endocrinienne
2 rue Michel Polonovski 59037 Lille Cedex
Tél : 03 20 44 53 21
robert.caiazzo@chru-lille.fr

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|-----------|
| GLOSSARY OF ABBREVIATIONS | 5 |
| SYNOPSIS | 6 |
| 1 BACKGROUND AND STUDY RATIONALE | 11 |
| 2 OBJECTIVES OF THE STUDY | 13 |
| 2.1 MAIN OBJECTIVE..... | 13 |
| 2.2 SECONDARY OBJECTIVES..... | 13 |
| 3 STUDY DESIGN | 14 |
| 3.1 EXPERIMENTAL PLAN..... | 14 |
| 3.2 STUDY POPULATION..... | 14 |
| 3.2.1 Inclusion criteria..... | 14 |
| 3.2.2 Exclusion criteria..... | 15 |
| 3.3 PRIMARY END POINT..... | 16 |
| 3.4 SECONDARY ENDPOINTS..... | 16 |
| 3.5 ASSESSMENTS..... | 16 |
| 3.5.1 Efficacy Assessments..... | 16 |
| 3.5.2 Safety Assessments..... | 17 |
| 3.6 NUMBER OF PATIENTS..... | 17 |
| 3.7 METHOD AND ANALYSIS STRATEGY..... | 18 |
| 4 LOGISTIC OF THE STUDY | 19 |
| 4.1 PLACES OF CONDUCTING THE RESEARCH..... | 19 |
| 4.2 STUDY ORGANIZATION..... | 20 |
| 4.2.1 Pre-screening phase..... | 20 |
| 4.2.2 Inclusion and Screening phase..... | 21 |
| 4.2.3 Randomization..... | 25 |
| 4.2.4 Treatment phase..... | 27 |
| 4.2.5 Follow-up..... | 29 |
| <i>Study schedule of procedures</i> | 32 |
| 4.3 STUDY DURATION..... | 33 |
| 4.4 RULES FOR STUDY TERMINATION..... | 33 |
| 4.5 INTERDICTION FOR SIMULTANEOUS PARTICIPATION – EXCLUSION PERIOD..... | 34 |
| 4.6 BENEFITS, RISKS AND STUDY CONSTRAINTS..... | 34 |
| 4.6.1 Benefits..... | 34 |
| 4.6.2 Risks..... | 35 |
| 4.7 DATA AND SAFETY MONITORING BOARD..... | 36 |
| 5 BIOLOGY & PATHOLOGY | 37 |
| 5.1 BIOLOGY..... | 37 |
| 5.1.1 Monitored biology for protocol..... | 37 |
| 5.1.2 Sample collection and storage conditions..... | 38 |
| <i>Summarize of samples management</i> | 40 |
| 5.2 PATHOLOGY..... | 41 |
| 5.2.1 Biopsy..... | 41 |
| 5.2.2 Histological diagnostic..... | 41 |
| 5.2.3 Computerized morphometry..... | 42 |
| 5.2.4 Slide shipment, blinding and traceability..... | 42 |
| 6 MANAGEMENT OF ADVERSE EVENTS | 43 |
| 6.1 DEFINITION..... | 43 |
| 6.2 ADVERSE EFFECTS AND RISKS RELATED TO THE PROTOCOL..... | 43 |
| 6.3 PROCEDURES IN PLACE IN ORDER TO RECORD AND REPORT ADVERSE EVENTS..... | 43 |
| 7 ACCESS TO DATA | 45 |
| 8 CONTROL AND QUALITY ASSURANCE | 45 |
| 9 ETHICAL AND REGULATORY REQUIREMENTS | 46 |

| | |
|---|----|
| 10 DATA ANALYSES AND STORAGE OF TRIAL DATA | 48 |
| 11 TRIAL FUNDING AND INSURANCE | 48 |
| 11.1 FUNDING..... | 48 |
| 11.2 INSURANCE..... | 48 |
| 12 PUBLICATION AND VALORISATION | 48 |
| 13 REFERENCES | 49 |

Glossary of abbreviations

| Abbreviation | Definition |
|--------------|-----------------------------------|
| NAFLD | Non Alcoholic Fatty Liver Disease |
| NASH | Non Alcoholic SteatoHepatitis |
| NAS | Nafld Activity Score |
| BMI | Body Mass Index |
| ALT | Alanine amino transferase |
| AST | aspartate amino transferase |
| GGT | Gamma Glutamine Transferase |
| ALP | Alkaline Phophatase |
| HbA1c | Glycated haemoglobin |
| HDL | High Dentisy Lipoprotein |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| MELD | Model for End stage Liver Disease |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| PBC | Primary Biliary Cirrhosis |
| PSC | Primary Sclerosing Cholangitis |
| PT | Prothrombine time |

Synopsis

| | |
|--------------------------|--|
| SPONSOR | University Hospital of Lille |
| TITLE | NASHsurg study: A randomized controlled study evaluating bariatric surgery as a treatment for severe NASH with advanced liver fibrosis in non-severe obese patients |
| STUDY COORDINATOR | Pr Philippe Mathurin |
| NUMBER OF CENTERS | 7 |
| STUDY TYPE | Prospective multicentric, open label, randomized clinical trial of superiority, with two arms, comparing bariatric surgery to the recommended medical treatment for NASH |
| OBJECTIVES | <p><u>Main objective:</u> To show the superiority of bariatric surgery on the disappearance of NASH without worsening of fibrosis in comparison to medical standard treatment in obese patients ($35 \text{ kg/m}^2 \geq \text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) with NASH complicated of advanced fibrosis (F3 and F4 fibrosis grade according to Brunt score), after one year of treatment.</p> <p><u>Secondary objectives</u> To assess the efficacy of bariatric surgery in comparison to medical standard treatment in obese patients with NASH complicated of advanced fibrosis to improve after one year of treatment: all histological features of NASH liver fibrosis CPT score and MELD score in patients with cirrhosis, the liver test biological profile the metabolic profile the weight loss the quality of life the complications</p> |
| STUDY DESIGN | <p>The NASHsurg study is an open, multicenter, randomized, parallel-group, controlled trial.</p> <p>The study will be proposed to obese patients (defined as a BMI between $30\text{-}35 \text{ kg/m}^2$) who are diagnosed at the stage of NASH with advanced fibrosis (F3 or F4 fibrosis grade according to the Brunt fibrosis score).</p> <p>The experimental group (A) : bariatric surgery The control group (B) : standard of care (lifestyle change)</p> |
| END POINTS | <p><u>Primary Endpoint:</u> Rate of disappearance of NASH without worsening of fibrosis grade at 60 weeks after randomization.</p> |

| | |
|----------------------------------|---|
| | <p><u>Secondary Endpoints:</u> Change from randomization to end of treatment in the NAS (Nafid Activity Score) score. Percentage of patients achieving at least a 2 point improvement in the NAS (≥ 2 points) without worsening of fibrosis grade from randomization to end of treatment. Change from randomization to end of treatment in the Brunt fibrosis score, Metavir score and fibrosis area, Change from randomization to end of treatment in CPT score and MELD score in patients with cirrhosis. Change from randomization to end of treatment in biological liver test (AST, ALT, bilirubin, GGT, ALP, and PT). Change from randomization to treatment in metabolic profile assessed by HOMA score or QUICKI score, Fasting glucose, HDL cholesterol, serum triglycerides, LDL cholesterol and total cholesterol. Change from randomization to end of treatment in the SF-36 quality of life score. Percentage of patients with at least one of the following complications: infection, thromboembolic complications, haemorrhage, rhabdomyolysis, hepatic decompensation and death Percentage of patient achieving 5 and 10% of weight loss from randomization to end of treatment.</p> |
| <p>INCLUSION CRITERIA</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Provide written informed consent and agree to comply to the study protocol prior to enrolment. - Patients 18 to 65 years of age - BMI ≥ 30 and kg < 35 kg/m². - Non-invasive tests: Fibroscan and Fibrometre[™] predicting a F3 or F4 fibrosis score grade (not necessary if previous liver biopsy has been performed) within 1 month before inclusion. - Patient should agree to have one liver biopsy during the screening period (4 months after inclusion) for the diagnosis purpose (if no histological biopsy within 1 month before inclusion is available) and one at the end of the treatment period for assessment of the treatment effects. - For patients with cirrhosis, patients must fulfil all the following criteria: <ul style="list-style-type: none"> - Platelets $> 125\ 000$ - PT $> 80\ \%$, - Albumin > 35 g/L - MELD score at inclusion < 8 - CPT score < 6 - No history of previous decompensation - No oesophageal varices (endoscopy) - No vascular shunt - ASA score \leq III - No alcohol consumption - For hypertensive patients, hypertension must be controlled by stable dose of anti-hypertensive medication for at least 2 months prior to screening (and the stable dose can be maintained throughout |

| | |
|-------------------------------|--|
| | <p>the study).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Female participating in the study must be either of non-child bearing (surgically sterilized at 6 month prior to screening or postmenopausal) or using an efficient contraception: hormonal contraception (including patch, contraceptive ring etc) intra-uterine device or other mechanical contraception - Patient agrees to come to the study visits within the protocol-specified delay |
| EXCLUSION CRITERIA | <ul style="list-style-type: none"> - BMI ≥ 35 kg / m² or < 30 kg/m² - Previous history of bariatric surgery. - Decompensated cirrhosis (MELD > 7 CPT score > 5, previous history of decompensation (encephalopathy, ascites, jaundice, varicose vein rupture) - Hepatocellular carcinoma - Platelets $< 125\ 000$; TP $< 80\%$; bilirubin < 20 mmol / l; albumin < 35 g / L - Other liver disease: alcohol consumption exceeding 20 g / day for women and 30g / day in men, HBV, HCV, CBP, CSP, autoimmune hepatitis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha-1 antitrypsin. - Being processed Cancer (chemotherapy, radiotherapy or hormone therapy) - HIV positive patients - Patients who had an acute cardiovascular episode, coronary Heart Disease (Angina pectoris, myocardial infarction, revascularisation procedure), stroke or TIA (Transient Ischemic Attack) within the 6 months prior to screening Recent cardiovascular events (stroke, myocardial infarcts, etc...) in the past 6 months. - Severe chronic respiratory disease. - Severe chronic cardiac insufficiency (grade III and IV of NYHA classification). - Pregnant or breastfeeding women. - Simultaneous enrolment in another clinical trial. - Drug abuse within the past year. - Patient with contra-indication for bariatric surgery |
| NUMBER OF PARTICIPANTS | <p>100 patients will be included to randomize 50 patients. Each group of treatment will have a sample of 25 patients. The rate of screening failure is estimated around 50% (in part due to the use of non-invasive test to screen patients).</p> <p>The primary objective is to show the superiority of bariatric surgery over medical standard treatment on the disappearance of NASH without worsening of fibrosis for non-severe obese patients. According to literature, we expected that the disappearance without worsening of fibrosis occurs in 30% of cases in the standard medical treatment and 70% in bariatric surgery arm. To detect this difference using a 2-sided Chi-square test with an alpha risk of 5% and power of 80%, 21 patients per arm would be required. To account for an anticipated rate of 20% of liver biopsy refusal (including loss) or with insufficient quality, we will randomized a total of 50 patients.</p> |

| | |
|--|--|
| <p>STATISTICAL METHODS</p> | <p><u>Main objective</u> The rate of disappearance of NASH without worsening of fibrosis after 60 weeks of randomization will be compared between the two arms using the Chi-square test. Absolute and relative risk difference (experimental vs. control arm) and their 95% confidence intervals will be calculated. Primary analysis will be conducted according to the intention-to-treat (ITT) principle. Missing values will be handled by multiple imputation procedure. Missing data will be imputed under missing at random assumption by using regression switching approach (chained equation with m=20 imputations) with predictive mean matching method for continuous variables, logistic regression on (binary, ordinal or polynomial) for qualitative variables. Imputation procedure will be performed separately in each arm using main baseline characteristics and multiple imputed data sets were combined using the Rubin's rules. Sensitivity analyses will be conducted in patients with available primary end point (case-complete analysis) and in patients without major deviation in protocol (per-protocol analysis).</p> <p><u>Secondary objectives</u> To compare differences in one-year changes in secondary quantitative endpoints between the 2 arms, the constrained longitudinal data analysis (cLDA) model proposed by Liang and Zeger will be used regarding the potential advantages of the cLDA compared to conventional longitudinal analysis of covariance (ANCOVA) model. In the cLDA, both the baseline and post baseline values are modeled as dependent variables using a linear mixed model (an unstructured covariance pattern model), and the true baseline means are constrained to be the same for the 2 treatment groups. Hence, the cLDA provides an adjustment for the observed baseline difference in estimating the treatment effects, using all available baseline and post-baseline values. The between-arm differences in one-year changes will be estimated by the time-by-arm interaction. If normality of model residuals will be not satisfied, nonparametric analysis will be used; absolute changes between baseline and one-year visits will be calculated and compared between the 2 arms using non-parametric analysis of covariance adjusted for baseline values.</p> <p>To compare the rate of composite complications (infection, thromboembolic complications, hemorrhage, rhabdomyolysis, hepatic decompensation and death) between the 2 arms, the chi-square test (or Fisher's exact test if the expected cell frequency <5) will be used. Frequency and percentage of individual's complications will be described in each arm.</p> |
| <p>RESEARCH BENEFITS AND RISKS EVALUATION</p> | <p>NASH is one of the three leading causes of cirrhosis in France. Unfortunately, no effective treatment is available and its severe form [advanced fibrosis ($\geq F3$)] has a poor prognosis.</p> <p>Epidemiological and clinical studies in severely obese patients report major benefit of bariatric surgery on survival and disappearance of NASH. Therefore, obese patients ($30 \leq \text{BMI} \leq 35 \text{ kg/m}^2$) with NASH and advanced fibrosis, have</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>limited therapeutic possibilities (lifestyle therapy) and could benefit from bariatric surgery that could reduce the risk of developing cirrhosis and its complications. High prevalence of diabetes and metabolic syndrome, associated with NASH, are also responsible for the increase in cardiovascular morbidity and mortality of these patients. Although competitive with the hepatic risk, cardiovascular mortality was significantly reduced after bariatric surgery. Such strategy in obese patients with NASH and advanced fibrosis could also reduce global mortality. Moreover, the benefit of such a study for selected patients is real. There will be no alternative treatment available before the end of the study. At the end of the study, if bariatric surgery is confirmed to be safe and effective in this specific population, a roll-over will be proposed to the patient of the control group.</p> |
| EXCLUSION PERIOD | No simultaneous participation or enrollment in another trial is allowed, during the study. |
| CONSTITUTION OF A SUPERVISION COMMITTEE | Yes |
| STUDY DURATION | <p>Patient recruitment: 36 months Last Patient Last Visit (follow-up 12 months):56 months Duration of participation for each patient : 20 months Cut-off for freezing the clinical database: 2022 Analysis of final data: 2022 Interpretation and publication of results: 2022-2023</p> |

1 BACKGROUND AND STUDY RATIONALE

Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) concerns about 25% of adults in Europe and its incidence is increasing worldwide ¹. Its severe form, NASH (Non Alcoholic steatohepatitis) is associated with rapid progression of fibrosis and leads to cirrhosis. Moreover, recent studies have demonstrated that fibrosis grade (Brunt score) ² is the most important prognostic factor for liver mortality in NAFLD. The hazard ratio for mortality for fibrosis assessed with Brunt score was 11.2 in patients with F1-F2 fibrosis and 85.8 for those with F3-F4 compared to patients without fibrosis^{3,4}.

NASH has been declared a public health issue by public health authorities. The endorsement of therapeutic endpoints for NASH by the United States (US) Food and Drug Administration (FDA) was important and facilitates development of new agents and treatment. The resolution of NASH, defined as the disappearance of necroinflammatory features (hepatocyte ballooning and portal inflammation) in histologic analysis, with an absence of evidence for fibrosis worsening, has been recognized as the endpoint for phase 2b and phase 3 trials of patients with NASH⁵.

Patients with NAFLD have a higher daily caloric intake and are more sedentary than those without. The first step, and the medical standard of care for the management of NASH is to obtain significant and sustained weight loss by changing the patient's lifestyle through diet and physical activity. However, this strategy leads to disappearance of NASH in only 20-30% because decrease in histological necroinflammation mainly occurs in patients with more than 10% of weight loss ⁶, a threshold difficult to reach ⁷. Another limit of lifestyle therapy is its poor efficacy to maintain weight loss at long-term. No specific diet is recommended in NASH or NAFLD.

In terms of pharmacological treatment, vitamin E is currently the only recommended drug in non-diabetic patients without cirrhosis ⁸ whereas experts are still seeking for data in diabetic patients. New drug are currently evaluated in phase III trials such as obeticholic acids ⁹ and elafibranor¹⁰. Phase II studies for those drugs observed around 30% of efficacy in terms of disappearance of NASH without worsening of fibrosis.

In severely obese patients (BMI) ≥ 40 or 35–40 with comorbidities), bariatric surgery induces sustained weight loss and has been recommended by the National Institutes of Health for motivated candidates. Regardless of procedure type, bariatric surgery induces long-term weight loss (of 15%–25%)¹¹, as well as remission of diabetes and reduced overall long-term mortality ¹² —particularly from diabetes ^{13, 14}, heart disease¹⁵, and cancers ¹⁶. Laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass have better metabolic effect on insulin resistance than gastric banding, but their better effect on long term mortality compared to gastric banding has not been proved.

In terms of liver injury, retrospective and prospective uncontrolled studies in severely and morbidly obese patients have shown improvement of histological features of NAFLD after bariatric surgery at short and long-term ^{17, 18}. In the subgroup of morbidly obese patients with histologically proven NASH, disappearance of NASH without worsening of fibrosis was observed in 70-90% of cases and improvement of fibrosis in 30% of cases ¹⁹.

The established short and long-term effects of bariatric surgery on metabolic profile and clinical outcomes in severely obese patients provide a robust rationale to evaluate its effect in non-severe obese patients with refractory metabolic complications. Indeed, recent randomized controlled studies in non-severe obese patients (BMI between 30-35 kg/m²) showed the superiority of bariatric surgery (sleeve gastrectomy and gastric bypass) over

medical strategy¹⁴. In 150 patients with uncontrolled diabetes, at 3 years of the bariatric surgery, only 5% of patient under medical therapy meet the primary endpoint (glycated hemoglobin < 6%) as compared to 38% with gastric bypass and 28% with sleeve gastrectomy. Furthermore quality of life was significantly better in the two surgical group, mainly due to the decreased use of glucose-lowering medications in the surgical groups (24.5 % and 21.1%) compared to the medical strategy (4.2%)¹⁴. Taking into account the importance of those data, FDA has recently approved the LAP-Band device (Allergan®) in the treatment of severe diabetic patients with a BMI between 30-35 kg/m² and scientific societies endorse the current surgical procedures of bariatric surgery for patients with a BMI between 30-35 kg/m² associated not only for those with severe diabetes resistant to medical therapy (Hba1c > 7.5%) but also for those with or other weight responsive comorbidities not achieving targets on conventional therapies (e.g. blood pressure, dyslipidemia, and obstructive sleep apnea).

Assessment of the perioperative risk is based, in part, on the classification of procedures as major or minor surgery. The most used classification is the *Shoemaker* classification²⁰. Using this classification, bariatric surgery is considered as a minor procedure. About the postoperative mortality of cirrhosis, a large study showed that survival of cirrhotic patients undergoing minor surgery was not significantly different than cirrhotic outpatients without surgery. In those undergoing major surgery, age > 70, ASA > III and MELD > 8 were the 3 independent prognostic factors in multivariate analysis. In terms of liver dysfunction, the risk of mortality starts to increase only in the subgroup of cirrhotic patients with MELD > 8²¹. The UNOS database of bariatric surgery has reported an increased mortality of 21-fold in patients with clinically decompensated cirrhosis and 2-fold in clinically compensated cirrhotics. In this UNOS register, MELD score, presence of portal hypertension (esophageal varices), previous episode of decompensation and biological parameters of liver function were not provided and analyzed²². As a consequence these register data cannot be extrapolated to cirrhotic patients highly selected and accurately classified as completely compensated (lack of portal hypertension, normal liver function, MELD score <8). For this purpose, our group evaluated the outcome of such highly compensated cirrhotic patients with normal platelets, normal PT and MELD score < 8. After bariatric surgery, 5 year survival of cirrhotics (95.5%) was not significantly different that non-cirrhotic patients (98.9%, p=0.32). Other teams have reported comparable favorable results, with good outcomes in cirrhotic patients after bariatric surgery²³. Analysis of this amount of data lead to conclude in the absence of increased risk of postoperative mortality after bariatric surgery in complete compensated cirrhotic patients (no previous or ongoing clinical decompensation, normal ranges of parameters of liver function) who, by definition, disclose MELD score around 5-6 and constantly < 8.

In terms of disease burden, non-severe obesity is more frequent than severe obesity explaining that non-severe obese patients constitute the most important group of patients likely to develop complications. In contrast to refractory diabetes, non-severe obese with advanced NASH patients have never been evaluated for bariatric surgery although they disclose a high risk of mortality. This group of patients with advanced NASH (grade F3-F4 of Brunt fibrosis score) without efficient therapy constitutes an unmet therapeutic need. The impressive effect of bariatric surgery observed in severely obese patients with 70-90% disappearance of NASH is a strong argument for its evaluation as severe diabetes in non-severe obese (BMI between 30-35 kg/m²). Such therapeutic development requires randomized controlled trials as previously performed for severe refractory diabetes.

The aim of the present work is to perform a randomized controlled pilot study testing the superiority of bariatric surgery in comparison to standard medical care.

2 Objectives of the study

2.1 Main objective

To show the superiority of bariatric surgery on the disappearance of NASH without worsening of fibrosis in comparison to medical standard treatment in obese patients ($36 \text{ kg/m}^2 > \text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) with NASH complicated of advanced fibrosis (F3 and F4 fibrosis grade according to Brunt Fibrosis score), after one year of treatment.

2.2 Secondary objectives

To assess the efficacy of bariatric surgery in comparison to medical standard treatment in obese patients with NASH complicated of advanced fibrosis to improve after one year of treatment:

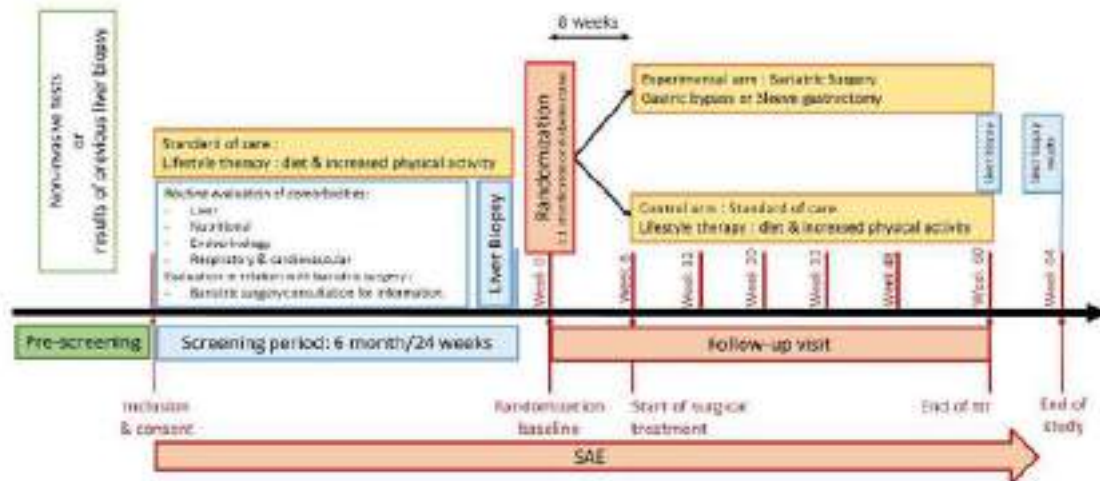
- all histological features of NASH
- liver fibrosis
- CPT score and MELD score in patients with cirrhosis.
- the liver test biological profile
- the metabolic profile
- the weight loss
- the quality of life
- the complications

3 Study design

3.1 Experimental Plan

The NASHsurg study is an open, multicenter, randomized, parallel-group, controlled trial. The study will be proposed to obese patients (defined as a BMI between 30-36 kg/m²) who are diagnosed at the stage of NASH with advanced fibrosis according to the Brunt fibrosis score. An advanced fibrosis is defined as a F3 or F4 fibrosis grade².

Figure: study design



3.2 Study population

Obese patients (non-severe, BMI between 30 and 35 kg/m²) who are diagnosed at the stage of NASH with advanced fibrosis (grade F3 and F4 Brunt score²).

3.2.1 Inclusion criteria

- Provide written informed consent and agree to comply to the study protocol prior to enrolment.
- Patients 18 to 65 years of age
- BMI ≥ 30 and kg < 35 kg/m².
- Non-invasive tests: Fibroscan and Fibrometre^{VM} predicting a F3 or F4 fibrosis score grade (not necessary if previous liver biopsy has been performed) within 1 month before inclusion
- Patient should agree to have one liver biopsy during the screening period (4 months after inclusion) for the diagnosis purpose (if no histological biopsy within 1 month before inclusion is available) and one at the end of the treatment period for assessment of the treatment effects.
- For patients with cirrhosis, patients must fulfil all the following criteria:
 - Platelets > 125 000
 - PT > 80 %.
 - Albumin > 35 g/L
 - MELD score at inclusion < 8
 - CPT score < 6
 - No history of previous decompensation

- No oesophageal varices (endoscopy)
 - No vascular shunt
 - ASA score \leq III
 - No alcohol consumption
- For patients with Type 2 diabetes, glycemia must be controlled (HbA1c \leq 9%). If glycemia is controlled by anti-diabetic drugs, qualitative change (i.e; implementation of a new anti-diabetic drug) is not permitted within 6 month prior to randomization and should be avoided during the study. Treatment with metformin, DPPIV inhibitors, GLP1 agonists, sulfamides and insulin are authorized. For GLP1-agonist, Liraglutide (VICTOZA®) is permitted if administrated 6 month before the study without dose modification. No introduction and/or daily dose modification of Liraglutide during the study.
 - For hypertensive patients, hypertension must be controlled by stable dose of anti-hypertensive medication for at least 2 months prior to screening (and the stable dose can be maintained throughout the study).
 - Female participating in the study must be either of non-child bearing (surgically sterilized at 6 month prior to screening or postmenopausal) or using an efficient contraception: hormonal contraception (including patch, contraceptive ring etc) intra-uterine device or other mechanical contraception
 - Patient agrees to come to the study visits within the protocol-specified delay

3.2.2 Exclusion criteria

Patients presenting any of the following exclusion criteria will not be included in the trial

- BMI \geq 35 kg / m² or < 30 kg/m²
- Previous history of bariatric surgery.
- Decompensated cirrhosis (MELD> 7 CPT score> 5, previous history of decompensation (encephalopathy, ascites, jaundice, varicose vein rupture)
- Hepatocellular carcinoma
- Platelets <125 000; TP <80%; bilirubin <20 mmol / l; albumin <35 g / L
- Other liver disease: alcohol consumption exceeding 20 g / day for women and 30g / day in humans, HBV, HCV, PBC, PSC, autoimmune hepatitis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha-1 antitrypsin deficiency.
- Being processed Cancer (chemotherapy, radiotherapy or hormone therapy)
- HIV positive patients
- Patients who had an acute cardiovascular episode, coronary Heart Disease (Angina pectoris, myocardial infarction, revascularisation procedure), stroke or TIA (Transient Ischemic Attack) within the 6 month prior to screening Recent cardiovascular events (stroke, myocardial infarcts, etc...) in the past 6 month.
- Severe chronic respiratory disease.
- Severe chronic cardiac insufficiency (grade III and IV of NYHA classification).
- Pregnant or breastfeeding women.
- Simultaneous enrollment in another interventional clinical trial.
- Drug abuse within the past year.
- Patient with contra-indication for bariatric surgery else than compensated cirrhosis.
- History of severe esophagitis on upper GI endoscopy (grade C or D of Los Angeles classification)
- Severe gastro-esophageal reflux disease, resistant to medical therapy
- Presence of dysplastic modification of the gastric mucosa or a history of gastric cancer on the upper gastrointestinal endoscopy.
- Presence of an unhealed gastro-duodenal ulcer or an ulcer diagnosed less than 2 month previously
- Presence of Helicobacter Pylori resistant to medical treatment

- Presence of a chronic diarrhea (≥ 3 loose or liquid stools per day over a period of more than 4 weeks)
- Binge eating disorders or other eating disorders according to DSM V criteria.
- Mentally unbalanced patients, under supervision or guardianship.

3.3 Primary End point

Rate of disappearance of NASH without worsening of fibrosis grade at 60 weeks after randomization.

The disappearance of NASH is defined as the disappearance of the two histological inflammatory features that are hepatocellular ballooning and lobular inflammation on the liver biopsy.

3.4 Secondary Endpoints

- Change from randomization to end of treatment in the NAS (Nafid Activity Score) score.
- Percentage of patients achieving at least a 2 point improvement in the NAS (≥ 2 points) without worsening of fibrosis grade from randomization to end of treatment.
- Change from randomization to end of treatment in the Brunt fibrosis score and fibrosis area and Metavir score,
- Change from randomization to end of treatment in CPT score and MELD score in patients with cirrhosis.
- Change from randomization to end of treatment in biological liver test (AST, ALT, bilirubin, GGT, ALP, and PT).
- Change from randomization to treatment in metabolic profile assessed by HOMA score or QUICKI score, Fasting glucose, HDL cholesterol, serum triglycerides, LDL cholesterol and total cholesterol.
- Change from randomization to end of treatment in the SF-36 quality of life score.
- Percentage of patients with at least one of the following complications: infection, thromboembolic complications, haemorrhage, rhabdomyolysis, hepatic decompensation and death
- Percentage of patient achieving 5 and 10% of weight loss from randomization to end of treatment.

3.5 Assessments

3.5.1 Efficacy Assessments

The patients will be follow-up during 64 weeks after the beginning of the treatment. After 60 weeks, all patients for each arm of treatment will perform a liver biopsy. The histological analysis will score 0 for the disappearance of NASH without worsening of fibrosis and 1 for persistent NASH or worsening of fibrosis.

This information will be obtained from a centralized, double blinded histological analysis. The liver tissue will be stained centrally. A double lecture will be performed by two pathologist experts. The disagreement between the experts will be discussed individually to reach a consensus. If a consensus cannot be obtained, a third expert will perform the histological analysis.

During each visit of the follow-up, the efficacy and the tolerance criteria will be assessed.

Liver Biopsy

Liver biopsy will be performed during the screening period (if no liver biopsy within 1 month before inclusion is available) and the end of the treatment period (visit V6, week 60)

No specific practice or procedure is requested in conducting liver biopsies; the standard biopsy procedure applied according to the good medical standards in each hospital is acceptable

Treatment with Vitamin E or Ursodeoxycholic acid should have been stopped at least 3 month prior the diagnostic liver biopsy and up to the end of the study.

However, if possible, is recommended biopsy procedure to be applied as :

- Needle core biopsy
- Biopsy obtain with a 16 gauge needle
- Length > 15 mm
- Preferably obtain biopsy from the right lobe.

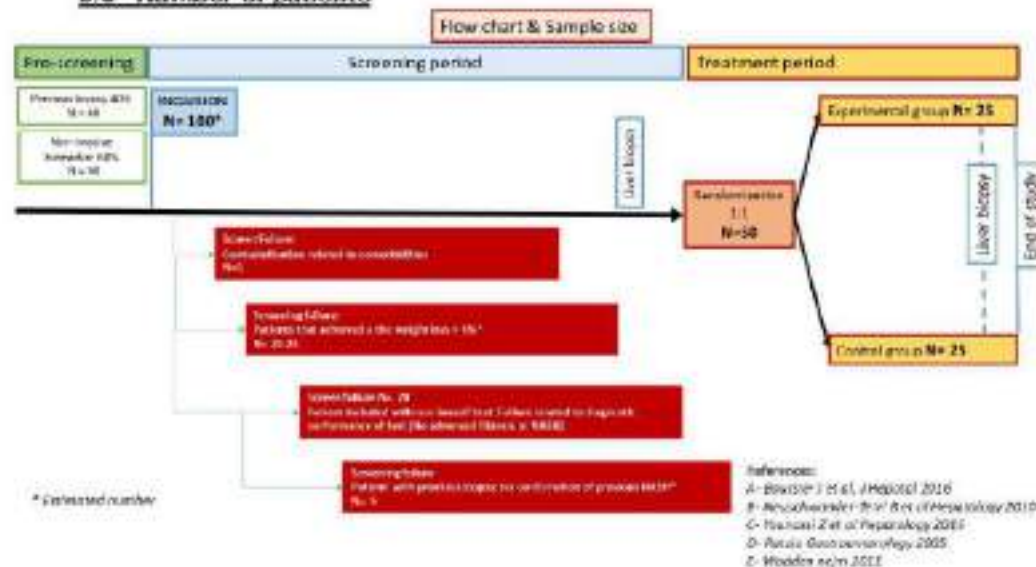
For each selected patient safety and coagulation test are performed in advance while premedication is taken in the morning of the procedure when the patient is admitted to the department. The local standard for the patient surveillance will be respected, allowing that when patient leaves the department no complication should be observed.

3.5.2 Safety Assessments

During treatment (64 weeks), treatment side-effects will be identified and recorded. Tolerance criteria will be evaluated at each visit, as well as the quality of life score SF-36. For the bariatric surgery group, the severity of the surgical complications will be assessed as recommended with the Dindo-Clavien classification ²⁴.

The presence of side effects as surgical complications (infection, bleeding, dumping syndrome) will be assessed during each visit using clinical and/or biological examination.

3.6 Number of patients



The primary objective is to show the superiority of bariatric surgery over medical standard treatment on the disappearance of NASH without worsening of fibrosis for non-severe obese patients. According to literature, we expected that the disappearance without worsening of fibrosis occurs in 30% of cases ^{6, 8} in the standard medical treatment and 70%

in bariatric surgery arm^{19,25}. To detect this difference using a 2-sided Chi-square test with an alpha risk of 5% and power of 80%, 21 patients per arm would be required. To account for an anticipated rate of 20% of liver biopsy refusal (including loss) or with insufficient quality, we will randomize a total of 50 patients.

The pre-screening phase will be based on fibrosis non-invasive test or history of previous biopsy of NASH with advanced fibrosis. We estimate that patients included on history of previous histological biopsy will concern 40% of patients. Thus 60% of patient will be included on non-invasive biomarker. This strategy will permit to avoid a liver biopsy that is associated to a multiple risks (please see the benefit/risk section). The positive predictive value for NASH in patients with an advanced fibrosis is between 70 and 80%^{1, 26}. Furthermore, the positive predictive of the combined fibrosis non-invasive tests (Fibroscan® and Fibrometre^{VM}Virus3G) is between 75 and 80%²⁷. As a consequence, we estimate that around 30% of patient included with the non-invasive biomarker will not meet the histological criteria for randomization.

We estimate on the available data of the literature, that around 20 to 30% of patient will lose > 5% of weight during the screening period. These patients will not be randomized.

Considering that the screening failure rate is around 5-10% for multiples reasons (contraindication to surgery, biopsy refusal, insufficient quality of the first biopsy etc)

The required sample size of patients for inclusion to randomize 50 patients is 100 patients. The total screening failure will be around 50%.

The detail of this calculation is shown in the above figure.

3.7 Method and analysis Strategy

Statistical analyses will be independently performed by the Biostatistics Department of University of Lille under the responsibility of Professor Alain Duhamel. Data will be analyzed using the SAS software (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and all statistical tests will be performed with a 2-tailed alpha risk of 0.05. A detailed statistical analysis plan will be written and finalized prior to the database lock. Baseline characteristics will be described for each arm. Quantitative variables will be expressed as mean (standard deviation), median (interquartile range) and range. Qualitative variables will be expressed as frequencies and percentages. Normality of distribution will be assessed graphically and using the Shapiro-Wilk test.

Main Objective:

The rate of disappearance of NASH without worsening of fibrosis, 60 weeks after randomization, (1-year of treatment) will be compared between the two arms using the Chi-square test. Absolute and relative risk difference (experimental vs. control arm) and their 95% confidence intervals will be calculated. Primary analysis will be conducted according to the intention-to-treat (ITT) principle. Missing values will be handled by multiple imputation procedure. Missing data will be imputed under missing at random assumption by using regression switching approach (chained equation with m=20 imputations) with predictive mean matching method for continuous variables, logistic regression on (binary, ordinal or polynomial) for qualitative variables²⁸. Imputation procedure will be performed separately in each arm using main baseline characteristics and multiple imputed data sets were combined using the Rubin's rules^{29,30}. Sensitivity analyses will be conducted in patients with available primary end point (case-complete analysis) and in patients without major deviation in protocol (per-protocol analysis).

Secondary Objectives:

To compare differences in one-year changes in secondary quantitative endpoints between the 2 arms, the constrained longitudinal data analysis (cLDA) model proposed by Liang and Zeger³¹ will be used regarding the potential advantages of the cLDA compared to conventional longitudinal analysis of covariance (ANCOVA) model³². In the cLDA, both the baseline and post baseline values are modeled as dependent variables using a linear mixed model (an unstructured covariance pattern model), and the true baseline means are constrained to be the same for the 2 treatment groups. Hence, the cLDA provides an adjustment for the observed baseline difference in estimating the treatment effects, using all available baseline and post-baseline values. The between-arm differences in one-year changes will be estimated by the time-by-arm interaction. If normality of model residuals will be not satisfied, nonparametric analysis will be used; absolute changes between baseline and one-year visits will be calculated and compared between the 2 arms using non-parametric analysis of covariance³³ adjusted for baseline values.

To compare the rate of composite complications (infection, thromboembolic complications, hemorrhage, rhabdomyolysis, hepatic decompensation and death) between the 2 arms, the chi-square test (or Fisher's exact test if the expected cell frequency <5) will be used. Frequency and percentage of individual's complications will be described in each arm.

4 Logistic of the study

4.1 Places of conducting the research

The study will be performed by Prof. Philippe Mathurin (coordinating investigator), Service des maladies de l'appareil digestif et de la nutrition, CHRU de Lille, France, together with the local research direction (Département de la recherche en santé). The coordinating investigator is known as an expert of the field. He has previously conducted many multicenter trials and is involved in the field of NAFLD and obesity (RHU). These points are major strength that are required to conduct this project.

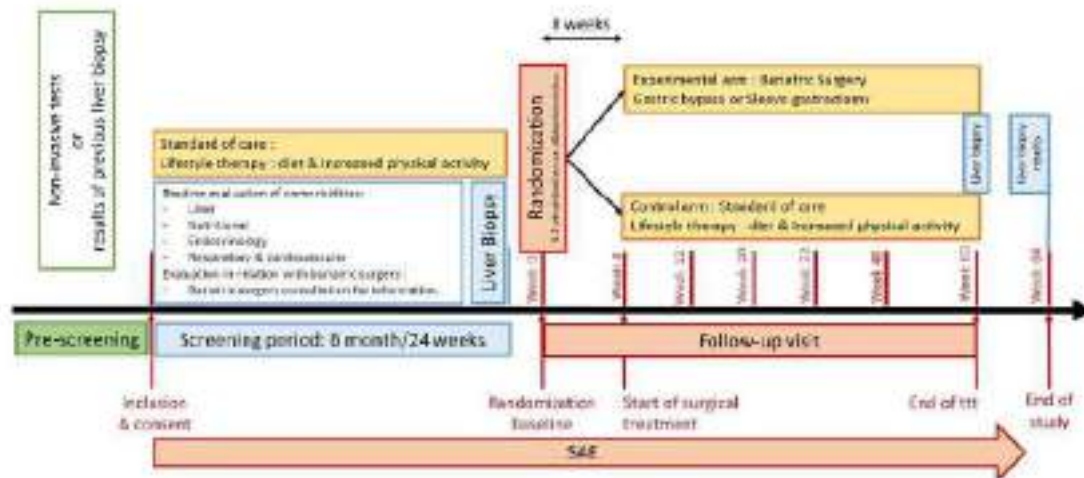
There will be a network of 7 participating centres in France (Hepatology, Nutritional and Bariatric surgery units). This network will include most of the centres that participate all ready to the Diabsurg study a multicentre French trial and all of them are part of the Force Network / FRENCH OBESITY RESEARCH CENTRE OF EXCELLENCE.

FORCE is a national network dedicated to clinical research for the study of obesity and related diseases.

Participating centres are listed on page 2 of the present protocol.

The study will be sponsored by The Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, France.

4.2 Study organization



4.2.1 Pre-screening phase

Potential subjects will be identified by investigators in hepatology department according to the results of non-invasive tests or to a previous histological diagnostic realized in the routine care.

After the pre-screening, patients may be included if results of non-invasive tests suggest the diagnosis of advanced NASH or if advanced-NASH have been previously histologically diagnosed.

A/ Patients included according to results of non-invasive methods

The non-invasive suspicion of advanced NASH will be based on the results of a combination of Fibroscan® and the Fibrometre^{VM}Virus3G. Only patients with Fibrometre^{VM}Virus3G ≥ 0.526 and Fibroscan® $\geq 9\text{kPa}$ will be included. In the setting of liver stiffness measurement, the quality of the measure is obtained with 10 valid measure and an IQR < 30%. The measure could be performed with the XL or the M probe. The threshold of 9 kPa is maintained whatever the type of probe. At the end of the screening period, liver biopsy will be performed that is in accordance with EASL (European Association for the Study of the Liver) and AASLD (American Association for the Study of Liver Disease) guidelines²⁴. Only patients with biopsy-proven advanced NASH will be randomized.

According to the literature, the combination of Fibrocan® and Fibrometre® has a positive predictive value of 70-80²⁷. Thus, 20-30% of patients (false positive test) will not disclose the histological diagnosis of NASH.

B/ For patients with advanced NASH diagnosed on previous liver biopsy

The biopsy will be read locally, as standard of care to confirm the histological diagnosis of NASH with advanced fibrosis (F3-F4)

4.2.2 Inclusion:

- The investigators will check again if patients fit with the study selection criteria
- The protocol schedule will be explained in detail. The inclusion will be performed by providing written informed consent prior to enrolment.

After consent form signing:

- For all patients, a clinical examination will be performed during this visit associated with laboratory tests (see table 6).
- The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.
- o For patients with advanced NASH diagnosed on previous liver biopsy performed within 1 month before inclusion:
 - 3 locally stained slides and the remaining paraffin blocks will be sent to the reference pathology center of CHRU de Lille for a centralized histological diagnostic confirmation and for computerized morphometry. (cf 5.2 Pathology p 40)

or

- o For patients with advanced NASH diagnosed on non-invasive methods or previous liver biopsy performed over 1 month ago before inclusion:
 - A new liver biopsy will be scheduled during the screening phase 4 months after inclusion.

4.2.3 Screening phase:

After inclusion, the duration of the screening period will be 6 to 12 months. This duration of medical management for obesity is recommended by the French Health Authorities for candidates to bariatric surgical strategy. Patients achieving at least 5% of weight loss will not be randomized for bariatric surgery according to the guidelines of French Health Authorities.

During this screening period, it is recommended that patient should have 4 different visits:

- **1/ dietary visit:** The dietary visit should be performed within the first month of the screening period. The aims of this consultation are the evaluation of the nutritional behavior of the patient, the daily calorie intake and provide the lifestyle recommendation for weight loss. The proposal for lifestyle change will be the NCEP-ATCIII recommendations (see please, below table 5). The lifestyle intervention for weight loss is the standard of care for NASH to obtain at least 5 % of weight loss.
- **2/ nutritional visit:** This visit is performed to reinforce the lifestyle recommendation. It is also necessary to explain the nutritional impact of bariatric surgery and the nutritional postoperative management. Furthermore, the nutritionist will clinically evaluate the patient for comorbidities related to obesity.
- **3/ psychological evaluation:** This evaluation is performed by a psychologist (or a psychiatrist) to screen binge eating disorders or other eating disorders according to DSM V criteria. Eating disorders and psychiatric disease are a contraindication for bariatric surgery.
- **4/ surgical visit:** Patient will meet the surgeon that will explain the 2 different procedures: sleeve gastrectomy or gastric bypass. He will detail the risk and the

complications of each surgery. The surgeon will also clinically evaluate the patient to be sure of the absence of surgical contraindication to bariatric surgery.

- During the screening period, patient will have a routine evaluation of obesity and screening of comorbidities as recommended before bariatric surgery (see table 1)

| Table 1: Exploration before bariatric surgery | Tests |
|--|--|
| Cardiovascular | |
| <i>Clinical evaluation with cardiologist</i> | Arterial Hypertension measurement Echocardiography Electrocardiogram (ECG), stress cardiac testing if recommended after cardiologist evaluation |
| Endocrinology | |
| | Fasting glucose, glycated hemoglobin, TSH |
| Dyslipidemia | |
| | Serum Triglycerides, Total cholesterol, HDL and LDL cholesterol |
| Nutritional | |
| <i>Nutritional evaluation</i> | Albumin, pre-albumin, vitamin A, C, 25 OH D, E, B1, B9, B12, iron status, Zinc |
| Respiratory | |
| | Lung function test Sleep polysomnography |
| Digestive | |
| | Upper endoscopy with gastric biopsy for <ul style="list-style-type: none"> - Helicobacter Pylori screening - GERD - Esophageal or gastric neoplasia |
| Psychiatric | |
| <i>Psychiatric or psychological evaluation</i> | |

- During the screening period, screening of complications related to liver disease will be performed:

| Table 2: Exploration related to liver disease | Test |
|--|------------------------|
| <i>Hepatocellular carcinoma</i> | Liver US |
| <i>Portal hypertension</i> | During Upper endoscopy |

- During the screening period, 4 months after inclusion, a liver biopsy will be performed. The condition of liver biopsy are detailed in the bellow table:

| Table 3: Recommendations for liver biopsy* | |
|---|--|
| Conditions to perform biopsy | |
| Localization | Normal coagulation test Wash out period of 3 months for Vitamin E or Ursodeoxycholic acid treatments Normal liver ultrasound at screening Harvest from the right lobe |
| Needle: | Needle core biopsy 16 gauge |
| Quality : | |
| Length | Minimal length 15 mm |
| Portal tracts | ≥ 10 portal tracts |
| Who | |
| Patients included on non-invasive test | Yes |
| Patients on previous liver biopsy | |
| - > 1 month before inclusion | Yes |
| - < 1 month before inclusion | No (if quality of liver sample fulfill the criteria) |
| When | |
| Screening period | 4month after inclusion (always before randomization) |
| Treatment period | Week 60 after randomization. |

*Detail on liver biopsy diagnosis and management are described in the section 6.2

To confirm the diagnosis of NASH with advanced fibrosis:

- A first reading will be done locally in each center
- A second blinded reading will be performed in the reference pathology center of CHRU de Lille by one of the referent pathologist: Dr Viviane Gnammi or Pr Emmanuelle Leteurre.
- In case of discrepancy between these local and central readings, a third blinded reading will be performed in Lille by the other one referent pathologist. The final diagnostic will be confirmed following consultation between the two referent pathologists.

The biopsy will have to complete the standard quality criteria (=15mm size and 10 portal tracts). If necessary a new biopsy must be proposed (please see table 3, and section VI biology and pathology).

For patients with biopsy-proven cirrhosis, a CT scan will be performed before the randomization to exclude any portal shunt, portal thrombosis and nodules not identified by liver US

4.2.4 Randomization

4.2.4.1 Randomization criteria

- BMI \geq 30 and kg $<$ 35 kg/m².
- Patient should have completed the 6 to 12 month period of screening recommended by French health agency before bariatric surgery and the recommended check-up for comorbidities related to obesity that contains:
 - o a/ Bariatric surgical consultation
 - o b/ Nutritional and diabetological evaluation
 - o c/ cardiovascular and respiratory evaluation
 - o d/ education & information related to behaviour after bariatric surgery
- Histologically proven NASH with advanced fibrosis with a F3 or F4 grade (Brunt score) confirmed by the Referenced Pathological Center. The liver biopsy criteria should have at least a length of 15 mm long and have to be performed before randomization.
- For patients with cirrhosis, patients must fulfill all the following criteria:
 - o Platelets $>$ 125 000,
 - o PT $>$ 80 %,
 - o Albumin $>$ 35 g/L,
 - o MELD score at randomization $<$ 8,
 - o CPT score $<$ 6,
 - o No history of previous decompensation,
 - o No oesophageal varices,
 - o No vascular shunt, ASA score \leq III,
 - o No alcohol consumption
- For patients with Type 2 diabetes, glycemia must be controlled (HbA1c \leq 9%). If glycemia is controlled by anti-diabetic drugs, qualitative change (i.e: implementation of a new anti-diabetic drug) is not permitted within 6 month prior to randomization and should be avoided during the study. Treatment with metformin, DPPIV inhibitors, GLP1 agonists, sulfamides and insulin are authorized. For GLP1-agonist, Liraglutide (VICTOZA®) is permitted if administrated 6 month before the study without dose modification. No introduction and/or daily dose modification of Liraglutide during the study.
- For hypertensive patients, hypertension must be controlled by stable dose of anti-hypertensive medication for at least 2 months prior to screening (and the stable dose can be maintained throughout the study).

4.2.4.2 Exclusion criteria before randomization

- Patient with weight loss of more than 5% within 6 month prior to randomization.
- Decompensated cirrhosis (MELD $>$ 7 CPT score $>$ 5, encephalopathy, ascites, jaundice, varicose vein rupture)
- Endoscopic or radiological portal hypertension
- Hepatocellular carcinoma
- Platelets $<$ 125 000; TP $<$ 80%; bilirubin $<$ 20 mmol / l; albumin $<$ 35 g / L.

- Other liver disease: alcohol consumption exceeding 20 g / day for women and 30g / day in humans, HBV, HCV, CBP, CSP, autoimmune hepatitis, hemochromatosis, Wilson's disease, alpha-1 antitrypsin.
- Being processed Cancer (chemotherapy, radiotherapy or hormone therapy)
- HIV positive patients
- Patients who had an acute cardiovascular episode, coronary Heart Disease (Angina pectoris, myocardial infarction, revascularisation procedure), stroke, TIA (Transient Ischemic Attack) or cardiovascular events (stroke, myocardial infarcts, etc...) during the screening period.
- Severe chronic respiratory disease.
- Severe chronic cardiac insufficiency (grade III and IV of NYHA classification).
- Drug abuse during the screening period
- Patient with contra-indication for bariatric surgery

4.2.4.3 Randomization visit

The randomization will be performed at the end of the screening period:

Patients presenting all the randomization criterias and none of the Exclusion criteria before randomization will be randomized in two parallel-groups (1: 1): one group will received bariatric surgery (experimental) and the other group will received the medical standard treatment defined as lifestyle therapy combining diet with increased physical activity (standard treatment, control) (figure 1, design of study).

The patient randomization numbers will be allocated sequentially in the order in which the patients are randomized. A dynamic randomization procedure by minimization will be done for achieving a balance of the following variables: center, diabetes status, cirrhosis, and presence of liver biopsy performed with the 1 month before inclusion. Patients will be randomized using the Clinsight system (ENNOV).

- For all patients, a clinical examination will be performed during this visit associated with laboratory tests (see table 1).
- A Fibroscan® and a Fibrometre^{VM}virus3G will be performed
- The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.
- A pedometer will be transmitted to the patient to monitor his physical activity.
- The histological features of the liver biopsy will be collected in the eCRF
- A β -HCG pregnancy test will be performed (for women of childbearing age only).

After randomization, in the experimental group (bariatric surgery) surgical procedure will be planned at 8 week (± 1 week). For patients randomized in the experimental group (bariatric surgery), an anesthesiologist and a surgical examination will be performed within this 8 week period.

The control group (standard of care) will perform a visit with the dietitian at 8 week (± 1 week).

4.2.5 Treatment phase

A/ Experimental group: Bariatric surgery

Surgical procedure will be performed within 8 weeks after randomization.

Patients that are randomized in the experimental group will perform a bariatric surgery. In this study, two different types of bariatric surgery can be proposed: laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass or a Laparoscopic sleeve gastrectomy.

Decision of the surgery type will be made according to surgical expertise, habits of investigation centers and the patient's desire. All patients receive nutritional support and therapeutic education adapted to recommendations bariatric surgery care.

The laparoscopic gastric banding will not be allowed in the study due to the metabolic superiority on the remission of diabetes with laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy. Indeed, with gastric bypass and sleeve gastrectomy the remission of diabetes at 3 years is around 65% versus 30% with gastric banding. Many data supports that gastric bypass and sleeve gastrectomy are significantly more effective on diabetes remission and on weight loss than gastric banding.

For patient with NASH cirrhosis (defined as a F4 grade of fibrosis on the Brunt score) the proposed surgery will be the sleeve gastrectomy. There are no data to prove a superiority or a better tolerance of the laparoscopic sleeve gastrectomy compared to laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass in cirrhotic patients. However, cirrhotic patients potentially request endoscopic surveillance that could be altered by the surgical change occurring after Roux-en-Y Gastric Bypass.

Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass

All the investigators centers have a large experience of gastric bypass performed by laparoscopy (more than 50 to 100/year) The procedure will be practiced as usual in all center as described in the state of the art.

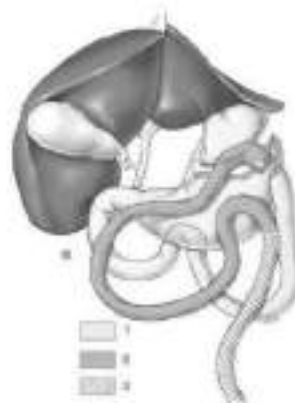
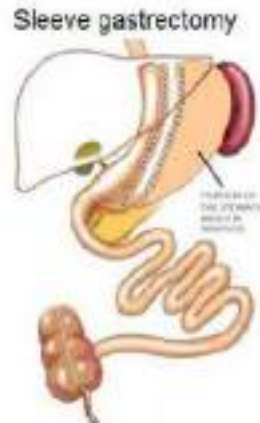


Figure 1: Roux-en-Y Gastric Bypass
1: biliary limb, 2: alimentary limb, 3: common limb

The surgical technique will be the same regardless of the investigator center (please see the above figure) The gastric pouch will have a volume lower than 50 cc ; (1) the biliary limb will have a length between 70 and 100 cm, (2) the alimentary limb will be between 120 and 150 cm long.

Laparoscopic sleeve gastrectomy:

All the investigator centers have a large experience of sleeve gastrectomy performed by laparoscopy (more than 50 to 100/year) The procedure will be practiced as usual in all center as described in the state of the art. During the sleeve gastrectomy, about 75 percent of the stomach is removed leaving a narrowgastric tube or "sleeve", No intestines are removed or bypassed during the sleeve gastrectomy.



B/ Control group: Standard of care.

In this group, patients continue the standard of care treatment of NASH that consists in lifestyle change therapy. By definition and due to the study design, patient, at this stage of the protocol, are randomized and did not yet achieve a weight loss > 5% within the 6 month screening period. Thus, for these patients, the lifestyle therapy maintained and will be closely follow-up with a 5 dietitian visits (week 8, week 20, week 32, week 48 and week 60). To help patient achieve significant weight loss, a pedometer will be given to all patients. The optimal physical activity is a target of 250 and 300 minutes per week (monitored by a pedometer).

The lifestyle change treatment is detailed in the table below and is adapted from NCEP-ATPIII recommendation:

Table 4: NCEP-ATP-III recommendations
Essential Components of the therapeutic Lifestyle Changes

| Component | Recommendation |
|---|---|
| LDL-raising nutrients | |
| Saturated fats* | Less than 7% of total calories |
| Dietary cholesterol | Less than 200 mg/day |
| Therapeutic options for LDL lowering | |
| Plant stanols/sterols | 2g/day |
| Increased viscous (soluble) fiber | 10-25 g/day |
| Total calories (energy) | Adjust total caloric intake to obtain 5 to 10% weight loss & prevent weight gain. |
| Physical activity | include enough moderate exercise to expend at least 200 kcal/day 250 min/week |

*Trans fatty acids are another LDL-raising fat that should be kept at low intake

The macronutrient recommendation that will be proposed in the diet will be adapted from the NCEP-ATP III recommendation.

Dietitian will adapt the diet to the medical history of the patient especially for diabetic patients. However the macronutrient recommendations are detailed below:

**Table 5: NCEP-ATP III recommendations
Macronutrient Recommendations for the lifestyle therapy**

| Component | Recommendations |
|----------------------------------|------------------------------|
| Polyunsaturated fat | Up to 10% of total calories |
| Monounsaturated fat | Up to 20% of total calories |
| Total Fat | 25-30% of total calories* |
| Carbohydrates[§] | 50-60% of total calories* |
| Dietary fiber | 20-30 g/day |
| Protein | Around 15% of total calories |

*ATP III allows an increase of total fat to 35% of total calories and a reduction in carbohydrate to 50% for patients with metabolic syndrome. Any increase in fat intake should be in the form of poly or monounsaturated fat

§Carbohydrate should be mainly derive from foods rich in complex carbohydrates including grains-especially whole grains-fruits and vegetable.

4.2.6 Follow-up

4.2.6.1 Experimental Group: Bariatric surgery arm

After randomization (V0 and baseline), patients will have the following follow-up visits:

- V1: Week 8 (±1): at time of surgery
- V2: Week 12 (±1): The first month after bariatric surgery (week 4+8)
- V3: Week 20 (±1): At 3 month after bariatric surgery (week 12+8)
- V4: Week 32 (±1): At 6 month after bariatric surgery (week 24+8)
- V5: Week 48 (±1): At 9 month after bariatric surgery
- V6: Week 60 (±1): At one year after bariatric surgery (week 52+8) + liver biopsy
- V7: Week 64 (±1): Visit for results announcement (week 60+4)

Visit 1 will be at time of surgery. All clinical and biological (cf. table 6) data will be collected just before surgery.

For nutritional follow-up the nutritionist/dietician will assess the daily calorie intake (a 30-min Food Frequency Questionnaire (FFQ).

The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.

Biology: The blood samples are detailed in the table 1 below.

Visit V2:

Patients will have a visit with the surgeon. This visit is recommended for the screening of postoperative complications.

The patient will also visit the hepatologist and the nutritionist (or dietician, depending on the practice of the center). The hepatologist will screen the AE and SAE, as well as liver function and decompensation. The dietician will assess the FFQ. A blood test for follow-up (cf. table 6) will be realized.

An upper endoscopy will be done, as recommended after bariatric surgery.

The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.

Visit V3, V4 and V5:

During these visits, the patients will have clinical examination with the hepatologist and the dietician (or nutritionist) for the postoperative follow-up. The hepatologist will screen the AE and SAE, as well as liver function and decompensation. The dietician will assess the FFQ.

Biology: cf. table 6.

For physical activity, the monitoring with the pedometer will quantify the physical activity. Patient will have a goal of 250-300 min per week.

The quality of life will be assessed with the SF-36 survey

Visit V6: Considering the routine practice for follow-up after bariatric surgery, all patients will be in hospital for 1 day. During this day, the patient will perform a liver biopsy to assess the primary endpoint of the study. The patient will also be evaluated by the hepatologist, the nutritionist and the surgeon.

- Biology: cf. table 6.
- A Fibroscan® and a FibrometreSMvirus3G will be performed
- For physical activity, the monitoring with the pedometer will quantify the physical activity. Patient will have a goal of 250-300 min per week.
- The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.
- The patient will perform a liver biopsy at week 60 (14 month after randomization) to evaluate the primary endpoint of the study.

The liver biopsy will be performed as recommended for NASHsurg (see table 3) to evaluate the primary endpoint of the study. After local reading, the slide and the paraffin block will be transmit to the reference pathology center of CHRU de Lille for a blinding reading (see 5.2 Pathology)

Visit V7

This visit will be announcement visit. The hepatologist will give to the patient the results of the liver biopsy and the response to treatment on the primary endpoint as well as secondary endpoints. The hepatologist will also screen the AE and SAE, as well as liver function and decompensation.

4.2.6.2 Control group: Medical standard care arm

After randomization (V0 and baseline), patients will have the following follow-up visits:

- V1: Week 8 (± 1): dietary visit. Re-evaluation of lifestyle habits (caloric intake and exercise) + pedometer
- V2: Week 12 (± 1): dietary visit
- V3: Week 20 (± 1): dietary visit
- V4: Week 32 (± 1): dietary visit
- V5: Week 48 (± 1): dietary visit
- V6: Week 60 (± 1): dietary visit + liver biopsy.
- V7: Week 64 (± 1): Visit for results announcement (week 60+4)

For visits V1, V2, V3, V4, V5

In the medical standard arm, (lifestyle therapy group), subjects will be given a 7 day weighed food record to detail their daily calories intake before each dietary visit. The dietary visit will be performed at the same time than the visits defined in the protocol.

The eating behaviour will be follow-up as well as cognitive dietary restraint, disinhibition, and susceptibility to hunger. These collected data will help patients and the registered dietician, so that patient could complete their diet and achieve their goal of 10% weight-loss. The daily caloric intake will be calculated with a dedicated program.

To monitor and follow-up the adhesion and the tolerance of the diet: a 30-min Food Frequency Questionnaire (FFQ) will be administered face-to-face by a Registered Dietician.

For physical activity, the monitoring with the pedometer will quantify the physical activity. Patient will have a goal of 250-300 min per week.

Biology: The blood samples are detailed in the table 6 below.

The quality of life will be assessed with the SF-36 survey.

Visit V6

In addition to the investigation performed during the other follow-up visits, a liver biopsy, a Fibroscan® and a Fibrometre™virus3G will be performed.

The liver biopsy will be performed as recommended for NASHsurg (see table 3) to evaluate the primary endpoint of the study. After local reading, the slide and the paraffin block will be transmit to the reference pathology center of CHRU de Lille for a blinding reading (see 5.2 Pathology)

End of study, visit V7:

At the visit V7, at week 64, the patient will be informed of the result of the liver biopsy (done at week 60). The results on the primary and secondary endpoints will be explained and detailed to the patient.

Study schedule of procedures,

| Study period | Inclusion | Screening | Randomization | Treatment | | | | | | End of study |
|---|-----------|-----------|---------------|-----------|----|----|----|----|----|--------------|
| Visit | V-1 | | V0 | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | V7 |
| Week (target +/- 7 days) | -24 | | 0 | 8 | 12 | 20 | 32 | 48 | 60 | 84 |
| Informed consent | X | | | | | | | | | |
| Inclusion/exclusion criteria | X | | X | | | | | | | |
| Demographics, Medical history | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Physical examination: Height, weight, waist circumference, etc | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Central reading of liver biopsy to confirm NASH & fibrosis grade | | X | | | | | | | X | |
| Liver biopsy | | X | | | | | | | X | |
| Pregnancy test | | | X | | | | | | | |
| Non-invasive test: Fibrometre [®] /Virus3G & Fibroscan | (X) | | X | | | | | | X | |
| HBV, HCV, hemochromatosis, alcohol, Wilson, autoimmune hepatitis* | X | | X | | | | | | | |
| Concomitant medications | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Quality of life survey (SF-36) | X | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Blood samples | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Pedometer | | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Clinical visits | | | | | | | | | | |
| Dietary: calories quantification, lifestyle (NCEP-ATP-III guidelines) | | X | | X | X | X | X | X | X | |
| Nutritionist (for postoperative management) | | X | | X | | X | X | X | X | |
| Hepatologist | X | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Bariatric surgery | | X | | X | X | | | | X | |
| Psychologist: eating behavior/DSM V criteria | | X | | | | | | | | |
| Primary endpoint evaluation: disappearance of NASH without worsening of fibrosis | | | | | | | | | X | |
| Secondary endpoint evaluation | | | | | | | | | | |
| NAS score | | | X | | | | | | X | |
| ≥2 points decrease in NAS | | | | | | | | | X | |
| Fibrosis Stage | | | X | | | | | | X | |
| Fibrosis Area | | | X | | | | | | X | |
| Glucose Metabolic profile: Fasting glucose, insulin, HbA1c | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Lipid Metabolic profile: Total Cholesterol, HDL-c, LDL-c, Triglycerides | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Liver test: AST, ALT, GGT, ALP, total bilirubin, PT | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Liver function (for cirrhotic patients): MELD score, CPT score | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Blood samples for biological collection | | X | X | | | | | | | X |
| Imaging & endoscopy | | | | | | | | | | |
| Liver Ultrasound | | X | | | | | | | X | |
| Abdominal CT scan (for cirrhotic patients only) | | X | | | | | | | | |
| Upper Endoscopy (at V2 for experimental group only) | | X | | X | | | | | | |
| Safety assessments | | | | | | | | | | |
| Hematology: WBC, hemoglobin, hematocrit, platelets | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Nutrition: Albumin, CPK, creatinine, urea, oncogram, vitamin | | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| Coagulation: PT, INR | X | | X | X | X | X | X | X | X | |
| Adverse events | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Compliance check | | X | X | X | X | X | X | X | X | |

4.3 Study duration

Enrolment period: 3 years

For a given subject: 20 months participation after inclusion

Duration of research: 56 months

End of the research term following participation of the last enrolled person

For details of the study duration, please see attached file.

The sponsor reserves the right to discontinue the study due to a lack of participants. The study may be terminated by decision of the competent joint authority, the sponsor or the research coordinator.

4.4 Rules for study termination

Premature Termination of Patient Participation in the Study:

Discontinuation of patient participation in the study

Patients can be withdrawn from the study under the following circumstances:

- Death;
- Intercurrent illness;
- Non-compliance (including loss of patient to follow-up);
- Voluntary withdrawal;
- Failure to meet the eligibility criteria for randomization.

Patients are free to withdraw from the study at any time without prejudice to their treatment.

When a patient decides to withdraw from the study, he/she will be contacted in order to obtain information about the reason for withdrawal and to record any adverse events.

Every effort will be made to contact patients who fail to return for scheduled visits. A patient is considered lost to follow-up if no information has been obtained when the last patient has completed the clinical phase of the study. During this time there must be documented attempts to contact the patient either by phone or letter.

Premature termination of the study

The study or the participation of individual sites may be prematurely terminated if, in the opinion of the Sponsor, there is sufficient reasonable cause. Any Investigator who wants to discontinue his/her participation in the study must immediately inform the Sponsor of this decision in writing.

Written notification documenting the reason for study termination will be provided to the Investigator by the terminating party.

Examples of circumstances that may warrant termination include:

- New findings, serious AEs or frequent AEs that invalidate the positive benefit-risk assessment of the study;
- AEs occur in such prominence (i.e. severity and frequency) that the proposed schedule can no longer be adhered to;
- Rate of recruitment is inadequate for a timely and orderly completion of the study within a reasonable time frame;
- Insufficient adherence to protocol requirements;
- Insufficient complete and/or evaluable data;
- Significant protocol deviations (in relation to eligibility criteria, primary endpoint or regulatory aspects) occur at a frequency that jeopardizes the validity and the safe conduct of the study.

If the study is prematurely terminated in one or more study sites, the relevant Investigators have to inform their patients and ensure appropriate follow-up and further treatment of the patients in accordance with the local standard practice.

4.5 Interdiction for simultaneous participation – Exclusion period

No simultaneous participation or enrollment in another interventional trial is allowed, during the study.

4.6 Benefits, risks and study constraints

4.6.1 Benefits:

The expected benefits of the trial are detailed bellow:

Experimental group:

General benefit:

Quality of life: Especially for patient with diabetes, the bariatric surgery treatment has been demonstrated to be associated with better life quality than medical therapy. Thus we can expect that diabetic patient will have the same beneficial impact. For non-diabetic patient, we also expect a beneficial on life quality even if patients do not have any reduction in their daily dose or the number of glycemic-control medication.

Weight loss: the median of expected weight loss is around 20-30% in the experiment group.

Specific benefit : primary endpoint

On the main outcome of the study (disappearance of NASH without worsening of fibrosis):

- We expect around 70 to 80% of disappearance of NASH without worsening of fibrosis^{19, 25}

Associated benefit

Other expected benefit: At one year after bariatric surgery, up to 70-90% of patients have an improvement of diabetes and a 60-70% have a remission of the disease¹⁴. Thus, as observed in other studies, we expect the same beneficial effect in this subgroup of patient.

The bariatric surgery has been demonstrated to reduce mortality at long term. This beneficial effect is expected in this high risk of mortality group.

Control group:

General benefit:

Quality of life: We expected that life quality will be optimize and increased with weight loss and increased physical activity. This has been previously described in the literature with the lifestyle improvement.

Weight loss: with lifestyle change therapy, the around 60 to 70% of patient will disclose a lower weight at the end of treatment as compared with baseline⁷. About 25-30% of patients will disclose $\geq 5\%$ of weight loss and around 10% will disclose $\geq 10\%$ of weight loss.

Specific benefit on primary outcome

A 5% weight loss is associated with an improvement of the histological features of NASH and in patient with at least 10% of weight loss a disappearance of the disease in 90% of cases⁹.

Other associated benefits:

Furthermore, the dietary optimization as well as the increase of physical activity will also reduce the severity of type 2 diabetes, the risk of cardiovascular event and improve metabolic profile (dyslipidemia)³⁵.

4.6.2 Risks:

4.6.2.1 Experimental group/ Bariatric surgery, post-operative complications

All complications (early and late) will be collected from visit V0 (surgery day) to the visit V7 (End of study). Complications will be collected for both study groups. Each complication will be detailed to standardize the data.

For postoperative complications, the gradation will be carried out according to the Dindo-Clavien classification²⁴. As the control group does not perform any surgery, this classification will be used for clinical description and not for statistical use. For each patient, all complications will be graded, but only the main cause will be accepted (grade of the most serious complication). The choice of the most severe complication will be left to the principal investigator.

Expected complication related to laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass

Early postoperative complications

Early complications are defined as an event happening within the 30 days after surgery.

They usually are:

Surgery complications: anastomotic leaks of digestive anastomosis (gastro jejunal and jejuno-jejunal) that can lead to a local abscess or peritonitis requiring reoperation, anastomotic hemorrhage, anastomotic stenosis with early dysphagia, peritoneal abscess, bowel obstruction, internal hernia, incisional hernia, wound infection, wound hematoma.

Medical complications: liver decompensation that can lead to ascitis, hepatic encephalopathy, infections or portal hypertensive hemorrhage; dumping syndrome; phlebitis, portal thrombosis and pulmonary embolism; pneumonia that can cause respiratory failure and cardiovascular event.

Late postoperative complications

A late complication occurs 30 days or more after surgery. They usually are:

Surgical complications: anastomotic ulcers that can lead to persistent pain or perforation, anastomotic stenosis with dysphagia, bowel obstruction, internal hernia, incisional hernia and hepato-biliary complications

Medical complications: dumping syndrome, diarrhea, hyperinsulinemic hypoglycemia, nephrolithiasis, severe and symptomatic nutritional deficiencies and food intolerance.

Expected complication related to laparoscopic sleeve gastrectomy

Early postoperative complications

Surgery complications: Staple line leak or fistula that can lead to a local abscess or peritonitis requiring reoperation or endoscopic drainage, anastomotic hemorrhage, anastomotic stenosis or stricture with early dysphagia, peritoneal abscess, bowel obstruction, internal hernia, incisional hernia, wound infection, wound hematoma.

Medical complications: liver decompensation that can lead to ascites, hepatic encephalopathy, infections or portal hypertensive hemorrhage, phlebitis, portal thrombosis and pulmonary embolism; pneumonia that can cause respiratory failure and cardiovascular event.

Late postoperative complications

Surgical complications: Staple line fistula, ulcers that can lead to persistent pain or perforation, anastomotic stenosis with dysphagia, bowel obstruction, internal hernia, incisional hernia and hepato-biliary complications.

Medical complications: GERD (about 20% of cases), hyperinsulinemic hypoglycemia, nephrolithiasis, severe and symptomatic nutritional deficiencies and food intolerance.

4.6.2.2 Risk related to the medical standard treatment

Diet:

No specific risk

Increased physical activity:

No specific risk

4.6.2.3 Risk of liver biopsy

Like any invasive percutaneous act, liver biopsy carries a risk of complications. However, two main complications are pain and bleeding. Pain occurs in 20-30% of case and can be prevented with medication before and during the procedure. Bleeding is extremely rare (less than 1 per 1000), but can be severe and lead to embolization, blood transfusion and exceptionally to death. Other complications are possible but remain exceptional. These complications can be favored by medical and surgical history or taking certain treatments. These rare complications usually occur within 6 hours following the examination but may occur exceptionally a few days after the examination (abdominal pain, fatigue, pallor).

To reduce the risk of severe outcome, all liver biopsy will be ultrasound guided. The patient will be follow-up and monitored in the ward during 8 hours after the liver biopsy.

4.7 Data and Safety Monitoring Board

The safety information from this study will also be reviewed by an independent DMC on an ongoing basis. The DMC (Data Monitoring Committee) can have access to partially blinded or unblinded data in order to determine if it is safe to continue the study according to the protocol. The DMC will be advised in writing by the promoter if an unexpected EIG is reported by an investigator during the study. It will determine the causality of the EIG. If need be, the committee will decide upon the outlet of the study or not for a patient.

The Committee has advisory function when the sponsor ask him for medical advice about tolerance or adverse events

5 Biology & Pathology

5.1 Biology

5.1.1 Monitored biology for protocol.

Laboratory tests will be carried out in centers in the usual operation of the management of blood samples from each hospital. Laboratory tests including complete blood count with platelet count, liver function tests (ALT, AST, GGT, PAL, and bilirubin), glycemic function and insulin resistance will be made at follow-up visits.

Table 6: Laboratory test

| Routine laboratory test | |
|--|--|
| Blood count (5mL EDTA tube) | |
| Prothrombine time, INR (5mL heparin tube pool) | |
| Albumin (5mL heparin tube pool) | |
| AST, ALT, GGT, ALP, bilirubin (5mL heparin tube pool) | |
| Ionogram (5mL heparin tube pool) | |
| Urea, creatinine (5mL heparin tube pool) | |
| Metabolic laboratory test | |
| Fasting glucose | |
| Insulinemia | |
| Total cholesterol, HDL, LDL cholesterol, serum triglyceride | |
| Glycated haemoglobin | |
| Pre- and Post-operative Nutritional follow-up (Bariatric surgery only except at V-1 and V0) | |
| Preoperative (V-1, V0 and V1) | Vitamins B1, B6 vitamins A, C, E Anti-GAD Ab Serology VHC, VHB, VIH (one time before surgery) |
| V2 | Vitamin B1 Prealbumin CRP |
| V3, V4 and V5 | Vitamins B1, B9, B12 Albumin, Prealbumin Serum iron, ferritin, transferrin saturation, iron binding capacity CRP TSH (for patients whit thyroid pathology only) |
| V6 | Vitamins B9, B12 (+ Vitamin B1 if vomiting occurs) 25 OH-Vitamin D Albumin, Prealbumin Serum iron, ferritin, transferrin saturation CRP PTH, TSH (for patients whit thyroid pathology only)* Activated Partial Thromboplastin Time For GBP patients only: Vitamin B1 and B6 Vitamin A, and E Anti-GAD Ab Erythrocytic Zinc and serum Zinc Micro-albuminuria (24H) |

5.1.2 Sample collection and storage conditions:

In order to better understand the pathogenesis of NASH, a biological collection will be done, in order to get new insights on serum and plasma non-invasive biomarker. All patients must have given their free and informed consent to the NASHsurg protocol. A dedicated paragraph of the written consent will explain the issues and interests of this biological collection. This collection will not result in any additional venipuncture. The tubes of biological collection will be taken during venipuncture for the monitoring biological balance detailed in the protocol.

The following tubes will be taken for biological collection:

- Day of liver biopsy during screening phase: 1 dry tube (7mL), 1 heparin tube (7mL) and 1 EDTA tube (5mL) will be frozen and stored at -80°C
- Start of the protocol (Visit 0, day 0 of protocol): 1 dry tube (7mL), 1 heparin tube (7mL) and 1 EDTA tube (5mL) will be frozen and stored at -80°C
- At the end of treatment (V6, W60): 1 dry tube (7mL), 1 heparin tube (7mL) and 1 EDTA tube (5mL) will be frozen and stored at -80°C

All samples will be stored in a de-identified fashion, meaning that they are labelled only with the coded identification number assigned to the study.

The samples will be transported by a certified transporter mandated by the Sponsor to the CRB/CIC of CHRU de Lille.

The CRB/CIC 14103 of CHRU de Lille will coordinate the storage of blood samples, their management, their identification, traceability or incidents.

Storage and centralisation of biological products will be coordinated by CRB/CIC 14103 of CHRU de Lille by a Biobank Management software ensuring a maximum traceability for each sample.

This system uses specific bar code labels. The software Databiotec® is situated and managed by the CRB/CIC 14103 of CHRU de Lille. The access to the software is controlled by a password. Each login is registered and the access is limited according the user's personal profile. Each movement (entry, exit, reintegration, temperature incidents) are registered in this software.

The software ensures the management of:

- subject's code number
- samples labelling
- tube content
- identification of the clinical trial
- sample entry and exit dates
- type of pathology
- each problem or incidence, if applicable

Each sample will be identified in a unique manner: the sample is connected to one study and one subject.

The sample is identified using a bar code. A bar code reader ensures the automatic access to all sample information. The method, staff, clinical data, complementary examination, contamination, quality, emplacement of blood samples will be registered.

DataBiotec® ensures a precise description of all types of storage material,

- Storage elements: shelves, drawers, racks, boxes.
- Storage management: occupied, reserved, free.

The software integrates the creation of samples which can be customized and therefore give logical groups:

- list of blood tests and blood samples in the same day
- of the same study
- of the same origin
- for the same technician
- in the same freezer

The temperature and storage conditions are controlled by continuous recordings and the different containers have a centralized alarm system. An emergency freezer is available in cases of a breakdown.

Storage rooms are secured (access control, intruder alarm, and CCTV).

If additional analyses are going to be performed, the transfer between the storage and the analysis centre will be ensured by a specialized transporter in dry ice and according to the transportation of hazardous goods Regulations.

In the case the subject who has withdrawn their consent the sponsor's sample withdrawal form, will destroy any remaining blood sample and any material obtained from the sample in accordance with the sponsor's procedure of sample destruction.

Summary of samples management

| Sampling time | Type of sample | Aim | Medium | Tube | Volume | On-site storage conditions | chillage conditions | Delivery frequency | Destination | Samples future |
|---|--------------------------------|---|----------------|---|--------------------------------|----------------------------|--|---------------------|--|---|
| V-1, 1st Biopsy, and V6 | Research | Biological collection | Blood | EDTA | 5mL | Storage at -80°C | Dry ice carriage | 1 expedition / year | CRB | 10 years Storage at -80°C |
| V-1, 1st Biopsy, and V6 | Research | Biological collection | Blood | Heparin | 7mL | Storage at -80°C | Dry ice carriage | 1 expedition / year | CRB | 10 years Storage at -80°C |
| V-1, 1st Biopsy, and V6 | Research | Biological collection | Blood | Dry | 7mL | Storage at -80°C | Dry ice carriage | 1 expedition / year | CRB | 10 years Storage at -80°C |
| V-1, V0, V1, V2, V3, V4, V5, V6 | Research: V1, V2, V3 and V5 | Blood count, INR, PT, Albumine, AST, ALT, GGT, ALP, bilirubin, ionogram | Blood | Usual Care of each center, results will be collected in the eCRF | | | | | | |
| | Usual care: V-1, V0, V4 and V6 | Urea, creatinine, Fasting glucose, Insuline, HbA1c | | | | | | | | |
| V-1, V0, V1, V2, V3, V4, V5, V6 | Research | Pre- and Post-operative Nutritional follow-up (cf. table 6) | Blood | Usual Care of each center, results will be collected in the eCRF | | | | | | |
| During the screening phase (or at most 1 month before the inclusion) and V6 | Screening: Usual care | NASH diagnostic and Computerized morphometry | Hepatic biopsy | 3 stained slides and The remaining Paraffin bloc used for slide preparation | usual procedure of each center | ambient temperature | Screening : Expedition after each biopsy | | Anatomy-Pathology department CHRU Lille | Return to the origin center at the end of the study |
| | V6: Research | | | | | | 1 Expedition at the end of the study | | | |

5.2 *Pathology:*

5.2.1 Biopsy:

The criteria for liver biopsy are detailed below.

| Table 3: Recommendations for liver biopsy* | |
|---|--|
| Conditions to perform biopsy | |
| <i>Localization</i> | Normal coagulation test Wash out period of 3 months for Vitamin E or Ursodeoxycholic acid treatments Normal liver ultrasound at screening Harvest from the right lobe |
| <i>Needle:</i> | Needle core biopsy 16 gauge |
| <i>Quality :</i> | |
| <i>Length</i> | Minimal length 15 mm |
| <i>Portal tracts</i> | ≥ 10 portal tracts |
| Who | |
| <i>Patients included on non-invasive test</i> | Yes |
| <i>Patients on previous liver biopsy</i> | |
| - > 1 months before inclusion | Yes |
| - < 1 month before inclusion | No (if quality of liver sample fulfill the criteria) |
| When | |
| <i>Screening period</i> | 4 month after inclusion (always before randomization) |
| <i>Treatment period</i> | Week 60 after randomization. |

5.2.2 Histological diagnostic:

The histological diagnostic will be performed as follow:

The slides will be stained locally by HES, trichrome de Masson and Perls.

- A first reading will be done locally in each center
- A second blinded reading will be performed in the reference pathology center of CHRU de Lille by one of the referent pathologist: Dr Viviane Gnemmi or Pr Emmanuelle Leteurre.
- In case of discrepancy between these local and central readings, a third blinded reading will be performed in Lille by the other referent pathologist. The final diagnostic will be confirmed following consultation between the two referent pathologists.

The NASH diagnostic and evaluation of fibrosis grade according to the Brunt Score will be transmitted by the referent pathologists to the patient's origin center at latest 8 week after the biopsy to confirm the randomization criterias.

5.2.3 Computerized morphometry:

A computerized morphometry analyze of the fibrosis area will be done in the reference pathology center of CHRU de Lille:

- The liver samples will be formalin-fixed and paraffin-embedded for histological analysis.
- Sections of liver tissue with a cutting thickness from 4 to 5 µm will be stained with Sirius red.
- Each block will be processed and analyzed for collagen content. Only the sections of each biopsy stained with Sirius red will be scanned with AxioSCAN.Z1 (Zeiss) for calculating the percentage of collagen. The 20x objective will be used to do the acquisition of the colored samples. An automated stage will move to reconstruct entire sample surface and a stitching algorithm will be used to combine multiple field images.
- The quantitative measure of fibrotic tissue (morphometry) will be calculated as the percentage of collagen content by digital image analysis (ImageJ). This software enables, through a greyscale slider, to select the total tissue area of liver biopsy. Subsequently, red, green, and blue (RGB) light channels will be used to select the collagen area. The percentage of total and collagen area will be calculated in batch using an homemade imageJ macro. After whole-section digital image capture, the measurement will include editing to eliminate structural collagen in large portal tracts, blood vessel walls, artefacts, vascular cavities, and lymphoid aggregates.³⁶⁻³⁸

5.2.4 Slides shipment, blinding and traceability

Each center will send to the reference pathology center of CHRU de Lille:

- o 3 locally stained slides for histological diagnostic
- o The remaining paraffin blocks used for the slides preparation. This block will be used for a new staying for NASH diagnostic if needed and to prepare Sirius red stained slides for morphometry analysis

Traceability

A traceability form has to be attached with the samples (see laboratory manual)

Blinding:

For Lille patients, the slides and the paraffin block will be de-identified with specific labels. The referent pathologists will not have access to the identity and anteriority of the patients

For slides and paraffin blocks transmitted by the other centers: A new labeling will be performed according to the CHRU de Lille procedures. The referent pathologists will not have access to the correspondence. They will not know the origin of the slides and blocks.

Return

At the end of the study, the reference pathology center of CHRU de Lille will return the paraffin blocks and slides to their origin centers. A traceability form will be attached to the samples.

6 Management of adverse events

6.1 Definition

Adverse event: any untoward event occurring in a subject who is a participant in biomedical research regardless of whether the adverse event is related to the research or the research product.

Adverse reaction: any adverse event related to research

Severe adverse events or reactions (SAE or SAR): any adverse event or effect that leads to:

- death
- is life threatening to subject participating in the research
- leads to hospitalization or requires longer than expected hospitalization
- leads to a long-lasting or severe handicap
- leads to a birth defect regardless of the administered dose
- any effect that is considered medically severe by the investigator

Unexpected adverse reaction: any adverse effect that differs from the information provided on the nature, the progression and the severity of effects expected by the products, applications and methodologies used during the study.

New Fact:

Any new fact or data leading to: a risk/benefit ratio of the study reassessment, a modification of study documents and procedures or a suspension or interruption of NASHsurg or another similar study.

6.2 Adverse effects and risks related to the protocol

| <i>Adverse effects & Specific risks related to the surgical procedure</i> | <i>Incidence</i> |
|---|--|
| <i>Sleeve gastrectomy</i> | |
| <i>Gastric leak</i> | <i>1-5%</i> |
| <i>Gastric stenosis</i> | <i>0.5-1%</i> |
| <i>GERD*</i> | <i>≈ 10-30%</i> |
| <i>Gastric bypass</i> | |
| <i>Bowel Obstruction</i> | <i>3-5% (mainly adhesion or internal hernia)</i> |
| <i>Stomal anastomotic stenosis</i> | <i>5-7%</i> |
| <i>Upper gastrointestinal hemorrhage</i> | <i>Rare < 1%</i> |

* GastroEsophageal Reflux Disease

6.3 Procedures in place in order to record and report adverse events

Responsibilities of the investigator:

The investigator shall notify the sponsor immediately without delay when he/she becomes aware of any serious adverse events during the trial period.

All serious adverse events must be reported on the form "Serious Adverse Events" present in the case report file. This form must be sent to the sponsor (Notification Team of the Clinical Research Federation) by fax 03 20 44 57 11.

For each adverse event, the investigator assesses the severity and causal link between the adverse event and:

- the act(s) performed,
- or the protocol.

Monitoring of adverse events will be provided by the investigator.

Responsibilities of the sponsor:

Reporting serious adverse events and adverse effects

For each event or serious adverse event, the sponsor evaluates the severity and causal link between the event or adverse reaction:

- the act(s) performed,
- or the protocol,

as well as the unexpected nature.

The sponsor is responsible for reporting to the MSNA and CPP any serious and unexpected adverse event which is attributable to act(s) performed and/or procedures used within 7 days.

Statement to investigators

The sponsor shall inform all investigators working on the study about serious adverse events or adverse effects that could have an adverse impact upon the safety of persons who have consented to the research.

Annual Safety Report

Once a year for the duration of the study, or upon request, the sponsor transmits to the ANSM and CPP a safety report. This safety report shall include a comprehensive analysis of the safety profile of the study protocol taking into account all the relevant new safety data. The safety information will appear in tabular form summarizing the serious adverse events or adverse effects in the biomedical research.

7 Access to data

The investigators will provide access to data sources to members of the competent administrative authority for auditing, monitoring or inspection purposes.

Investigators agree to be audited and provide access to study data sources (medical records, computer files, study documents ...). During these visits subject to agreement by the investigator, the following may be audited:

- Compliance with the protocol and associated procedures
- Quality assurance of collected data in case reports: accuracy, missing data, data consistency, control of source documents.

8 Control and quality assurance

- **Trial schedule**

A kick-off meeting to begin the study will be organized in each center with the Principal Investigator (PI) and a sponsor representative. The aim of kick-off meeting is to explain the protocol and trial schedule as well as the roles and responsibilities of the investigator and sponsors (CGP, monitoring, safety). The PI will keep the sponsor informed of the enrollment schedule

- **Study monitoring**

To ensure accurate data collection, case report forms (CRFs) will be checked regularly by the sponsor's Clinical Research Associate (CRA). During trial site monitoring visits CRAs will have free access to:

- CRFs with data from patients included in the study;
- medical files and nursing files for these patients;
- the investigator's notes.

This protocol has been assigned to the low risk research category. The goal of monitoring will therefore be to :

- confirm that patients are enrolled and have signed the informed consent form;
- confirm that inclusion criteria are respected;
- confirm the main primary end-point
- follow and report SAE
- identify any unexpected events that may require amendment.

- **Data collection**

Data will be recorded in an electronic case report forms (eCRF), developed using Clinsight (ENNOV). The eCRF will be subjected to data entry at each investigator site and every center will be responsible of the patient's anonymization. The eCRF will be created, tested and validated before the start of data capture. The essential data necessary for monitoring the primary and secondary endpoints will be identified and managed at regular intervals throughout the trial. Data will be monitored by the data management team of the data-management department of University Hospital of Lille by using the predefined rules and queries will be automatically edited. Finally, an overall automated monitoring will be done by the data manager at the end of the data entry. In case of discrepancies, queries will be edited to resolve the problems encountered.

- **End of the study**

At the end of the trial there will be a closing procedure. Documents and data will be classified. Once the final data analysis has been performed and validated, all of the data will be sealed and archived in a locked room.

9 Ethical and regulatory requirements

The research will be performed in accordance with the protocol, good clinical practices, and the legislative and regulations in effect.

The investigator is responsible for the progression of the trial.

The investigator agrees:

- To keep data sources as well administrative documents in relation to the protocol,
- Not to include patients before receiving official approval from the Ethic's Committee and the expert authorities,
- To follow the protocol,
- To perform the trial in accordance with moral, regulatory, ethical and scientific principles governing clinical research,
- To obtain the informed, written consent from each participant,
- To report any serious adverse events.

The subjects will receive complete oral and written information explaining the steps of the trial. A letter of information will be given to the subject by the investigator or the doctor representing the investigator before the patient is included in the study.

An informed consent form (enclosed to the protocol) will be obtained from each patient before they are included in the study.

The informed consent form will be signed by the patient

No specific act of the protocol may begin without first obtaining the signed consent of the patient or his/her representative.

Three copies of the letter of information and the consent form will be drafted and 1 copy will be given to the patient or his/her representative.

- The consent form will be signed by the investigator or the doctor representing the investigator and by the patient or his/her representative.

Registration in the national register for individuals participating in -biomedical research

Any person that accepts to participate in the study will be registered by the investigator, in the national register of individuals participating in biomedical research.

Registration will be performed in accordance with decree dated November 14, 2006 in relation to gathering data in the national register of individuals participating in biomedical research.

Approval from the Expert Authorities (EA) and the opinion of Ethics Committee (EC)

The sponsor will submit a request for approval to the competent national authority (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments, ANSM) and obtain approval from the Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes, CPP) before beginning the study, in accordance with article L1121-4 of the Public Healthcare Code.

Modifications to the protocol:

The sponsor is the only person that is authorized to modify the protocol after consulting with the coordinating investigator.

“Substantial modifications” mean modifications that significantly influence any aspect of the trial, in particular the protection of patients participating in the trial, including their safety, the validity of the study, the quality and safety of the tested products, the interpretation of the scientific documents explaining the phases of the study or its .

A request for a substantial modification shall be submitted by the sponsor either to the competent national authority or to the Ethics committee, or both, depending on the case, for approval and/or opinion. As soon as the approval and/or positive opinion is/are received, an amended version of the protocol will be transmitted to the investigators by the sponsor.

A **“non-substantial modification”** means minor modifications or clarifications that do not affect the performance of the trial. These modifications are not submitted to the competent expert authorities but do require the agreement of the sponsor and the investigator and will be clearly documented (in the study file)

10 Data analyses and storage of trial data

Personal data collected during the study will be reported on a laboratory notebook. After, it will be entered into a computerized data analysis system. Data will be confidential, in accordance with the law dated January 6, 1978.

Data will be analyzed in accordance with methodology described in MR 06001 of the CNIL in the platform of epidemiology and biostatistics "Clinique de santé publique" of the CHU Lille managed by Prof Alain Duhamel.

Access to data will be restricted to individuals who are directly involved in the study. Data may be modified by any physician participating in the study or a fellow working with a physician participating in the study.

Trial data will be archived for at least 15 years after the trial has ended.

11 Trial funding and insurance

11.1 Funding

Grant pending (Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2016)

11.2 Insurance

The sponsor has signed an insurance contract covering his liability and that of all the other participants in the study, in accordance with Article L1121-10 of the Code of Public Health.

Clinical trial participants will be provided on request with the conditions of insurance along with the patient information and consent form.

12 Publication and valorisation

The investigator study coordinator will prepare the final report of the study as required by law, and send to the developer.

In accordance with Article R 5121-13 of the Code of Public Health, the tests may not be subject to any written comments or oral without the joint agreement of the investigator and sponsor. Any publication must mention that the University Hospital of Lille applies as sponsor. In any event, the University Hospital of Lille, sponsor of the study, has the control of the first publication. The investigator shall send a copy of its publications to the proponent.

The sponsor is the exclusive owner of the results of the study. These results, as well as all data relating to the research, should never be given to third parties without previously negotiated by the Direction for Research in Health counterpart. Any such solicitation must be submitted as soon as possible for Legal Affairs of the Direction for Research in Health

13 REFERENCES

1. Youmossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
2. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
3. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015;149:389-97 e10.
4. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 2015;61:1547-54.
5. Sanyal AJ, Friedman SL, McCullough AJ, et al. Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology* 2015;61:1392-405.
6. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367-78 e5; quiz e14-5.
7. Wadden TA, Volger S, Sarwer DB, et al. A two-year randomized trial of obesity treatment in primary care practice. *N Engl J Med* 2011;365:1969-79.
8. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675-85.
9. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956-65.
10. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016;150:1147-1159 e5.
11. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:1724-37.
12. Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007;357:741-52.
13. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, et al. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2012;366:1577-85.
14. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med* 2014;370:2002-13.
15. Sjostrom L, Peltonen M, Jacobson P, et al. Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA* 2012;307:56-65.
16. Sjostrom L, Gunnarsson A, Sjostrom CD, et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol* 2009;10:653-62.
17. Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, et al. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology* 2006;130:1617-24.

18. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology* 2009;137:532-40.
19. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* 2015;149:379-88; quiz e15-6.
20. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB, et al. Prospective trial of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patients. *Chest* 1988;94:1176-86.
21. Teh SH, Nagorney DM, Stevens SR, et al. Risk factors for mortality after surgery in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2007;132:1261-9.
22. Mosko JD, Nguyen GC. Increased perioperative mortality following bariatric surgery among patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:897-901.
23. Pestana L, Swain J, Dierkhising R, et al. Bariatric surgery in patients with cirrhosis with and without portal hypertension: a single-center experience. *Mayo Clin Proc* 2015;90:209-15.
24. Dindo D, Muller MK, Weber M, et al. Obesity in general elective surgery. *Lancet* 2003;361:2032-5.
25. Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* 2004;39:1647-54.
26. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM, et al. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:913-24.
27. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;65:570-8.
28. van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K. mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software* 2011;45:1-67.
29. Rubin DB, Schenker N. Multiple imputation in health-care databases: an overview and some applications. *Stat Med* 1991;10:585-98.
30. Li KH, Meng XL, Raghunathan TE, et al. Significance Levels from Repeated P-Values with Multiply-Imputed Data. *Statistica Sinica* 1991;1:65-92.
31. Zeger SL, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 1986;42:121-30.
32. Liu GF, Lu K, Mogg R, et al. Should baseline be a covariate or dependent variable in analyses of change from baseline in clinical trials? *Stat Med* 2009;28:2509-30.
33. Vickers AJ. Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. *BMC Med Res Methodol* 2005;5:35.
34. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592-609.
35. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013;368:1279-90.
36. 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* 2014;49:527-37.
37. Sandrini J, Boursier J, Chaigneau J, et al. Quantification of portal-bridging fibrosis area more accurately reflects fibrosis stage and liver stiffness than whole fibrosis or perisinusoidal fibrosis areas in chronic hepatitis C. *Mod Pathol* 2014;27:1035-45.

38. Stasi C, Leoncini L, Biagini MR, et al. Assessment of liver fibrosis in primary biliary cholangitis: Comparison between indirect serum markers and fibrosis morphometry. *Dig Liver Dis* 2016;48:298-301.