



HAL
open science

Implications du microbiote intestinal et de la pectine dans la stéato-hépatite non-alcoolique

Camille Houron

► **To cite this version:**

Camille Houron. Implications du microbiote intestinal et de la pectine dans la stéato-hépatite non-alcoolique. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ001 . tel-03432631

HAL Id: tel-03432631

<https://theses.hal.science/tel-03432631v1>

Submitted on 17 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.

Implications du microbiote intestinal et de la pectine dans la stéato-hépatite non-alcoolique

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation thérapeutique du fondamental à
l'appliqué

Spécialité de doctorat: Physiologie-Physiopathologie
Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance, 92290,
Châtenay-Malabry, France.
Réfèrent : Faculté de Pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 15
Septembre 2020, par

Camille HOURON

Composition du Jury

Jean-Charles DUCLOS-VALLEE

PU-PH, Université Paris-Saclay

Président

Catherine POSTIC

DR, HDR, Université Paris-Descartes

Rapporteur & Examinatrice

Fatima TEIXEIRA-CLERC

CR, HDR, Université Paris-Est

Rapporteur & Examinatrice

Philippe DELERIVE

DR, Institut de Recherches Servier

Examineur

Gabriel PERLEMUTER

PU-PH, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Anne-Marie CASSARD-DOULCIER

DR, HDR, Université Paris-Saclay

Co-directrice de thèse

CITATIONS

“ La **théorie**, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici nous avons réuni théorie et pratique, rien ne fonctionne et on ne sait pas pourquoi. »

A.Einstein

« Mangez des pommes ! »

J.Chirac

REMERCIEMENTS

Trois ans plus tard : on y est ! Et difficile de trouver les bons mots pour remercier tous ceux qui par leur présence ont contribué à cette aventure.

Dans un premier temps je souhaite remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse : le Dr Anne-Marie Cassard et le Pr Gabriel Perlemuter. Merci pour votre confiance et votre accueil au sein de votre équipe. Merci pour votre accompagnement et l'éclairage scientifique apporté tout au long de ces trois années.

Je tiens également à remercier grandement le Pr Jean-Charles Duclos-Vallée pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et les Dr Catherine Postic et Fatima Teixeira-Clerc pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci aussi au Dr Philippe Delerive pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse mais surtout pour m'avoir témoigné votre confiance il y a 3 ans en acceptant de m'octroyer une bourse CIFRE me permettant de mener à bien ce projet.

Un grand merci également à l'ensemble de l'Unité U996 et à toutes les personnes qui de par leur accueil et leur présence ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Merci pour vos encouragements, vos personnalités multiples et votre accompagnement.

Un immense MERCI à l'ensemble de la GP Team sans qui tout cela n'aurait clairement pas été possible. Laura, Madou, Cindy, Vanessa, Dragos et Nicolas : MERCI pour votre accueil même si j'ai débarqué dans votre vie un peu comme un boulet 😊. Merci pour toutes ces discussions scientifiques ou non qui m'auront permis d'aller au bout de ces trois ans. Merci d'avoir été vous et d'avoir su créer une équipe indéfectible et soudée. Merci pour cette belle intégration ponctuée d'une bonne dose d'humour et de sarcasme. Il reste encore pas mal de chemin à parcourir pour conquérir le monde...

Merci aussi à ma famille et notamment mes parents, Gwen et Val et l'ensemble de la tribu Bossard pour leur soutien sans faille pendant ces 3 années. Merci pour les solides valeurs inculquées. Elles m'auront bien servies.

Une immense pensée également à mes amis et copains de tout horizon. Merci de votre présence, de votre soutien et de vos conseils dans les grandes joies & les petites peines. Merci de votre accompagnement précieux non seulement pour cette thèse mais de manière plus globale dans l'ensemble de mes projets de vie.

AVANT-PROPOS

La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) correspond à la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Son accroissement drastique dans la population mondiale est corrélée à l'épidémie d'obésité et à l'augmentation du diabète de type II. La NAFLD est un enjeu mondial majeur et représente un coût de santé publique important au vu des complications engendrées. La communauté scientifique estime que la NAFLD deviendra dans les prochaines années la première cause de transplantation hépatique. La NAFLD peut en effet se compliquer d'une NASH associant un contexte inflammatoire à l'accumulation de lipides dans le foie. Le foie peut ensuite développer une fibrose et évoluer vers une cirrhose voire vers un carcinome hépatocellulaire.

A ce jour, aucun traitement pharmacologique spécifique n'a été approuvé par les autorités de santé. De nombreux efforts sont mis en place pour permettre un meilleur diagnostic et comprendre les mécanismes de la pathogenèse de la NAFLD. Si des facteurs extérieurs comme les régimes gras influencent l'avènement de cette hépatopathie nutritionnelle, une susceptibilité individuelle est également présente et explique pourquoi seule une partie des patients développera des complications. Le microbiote intestinal a montré son implication dans le développement de la NAFLD et de la NASH et apparaît comme une piste thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge, soit directement, soit par le biais de ses métabolites comme les acides gras à chaîne courte. Des axes entre le MI apparaissent comme l'axe foie-intestin mais également intestin-tissus adipeux et témoignent des liens forts existants entre le MI et les organes périphériques.

Les régimes occidentaux sont enrichis en graisses, en sucres et appauvris en fibres. Ils sont à l'origine d'une modification délétère du MI que l'on appelle la dysbiose. Cette dysbiose peut être modulée par l'ajout de fibres au régime. L'une d'entre elles, la pectine, a montré son potentiel bénéfique dans un certain nombre de pathologies métaboliques.

Le but de ce travail de thèse était donc d'asseoir le potentiel thérapeutique de la pectine par son action sur le MI dans la NAFLD, que ce soit en préventif ou en curatif et de mieux comprendre l'impact du MI sur les organes impliqués dans la NAFLD et notamment le foie et le tissu adipeux.

La première partie de cette thèse situe la NAFLD et ses différents aspects par rapport aux dernières avancées scientifiques sur ce sujet. Cette revue de littérature informe ainsi sur les données épidémiologiques présentes et futures de la NAFLD puis développe les hypothèses mécanistiques impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD et ses complications. La NAFLD étant une pathologie extrêmement complexe, nous avons choisi de nous centrer sur certains acteurs de la pathologie à

savoir le foie, les tissus adipeux, le microbiote intestinal et ses métabolites. Puis nous terminerons par les options thérapeutiques envisagées pour le traitement de la NAFLD/NASH.

La deuxième partie du manuscrit correspond au travail de thèse où nous explorerons le potentiel préventif et curatif de la pectine à faible dose et son impact sur la composition du microbiote intestinal et de ses métabolites. Ce travail de thèse vise à caractériser les liens entre le potentiel bénéfique d'une supplémentation en pectine dans un régime gras et les modifications morphologiques et fonctionnelles induites au niveau d'organes clés comme le foie et les tissus adipeux blancs et bruns. Nous nous intéresserons par la suite à l'impact d'une haute dose de pectine sur la prévention de la NAFLD. Enfin nous définirons les perspectives thérapeutiques mises en évidence par ces travaux et notamment celles relatives à la modulation du MI et de ses métabolites.

LISTE DES ABREVIATIONS

AASLD: American Association for the Study of Liver Diseases

AB: Acides biliaires

ABCC2: ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACOX1 : Acyl-coenzyme peroxysomale A oxydase 1

AG : Acides gras

AGTR1: Angiotensin II Receptor Type 1

AhR : Récepteur aux hydrocarbures aromatiques

ALAT: Alanine aminotransférase

ALIOS: American Lifestyle Induced Obesity Syndrome

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ASAT: Aspartate aminotransférase

ATGL : Adipose triglycérique lipase

BAT: Tissu adipeux brun

BCAA : Acides aminés branchés

BCFA : Acides gras branchés

BHI : Brain Heart Infusion

CCL2/5: Chemokine ligand 2 ou 5

CCL4 : Tétrachlorure de carbone

CCR2/5 : C-C chemokine receptor type 2 ou 5

CDAA : Choline deficient amino acid

CDCA: Acide chénodeoxycholique

Cellules M : Microfold cells

CHC: Carcinome hépatocellulaire

CHOP : CCAAT-enhancer binding protein homologous protein 1

ChREBP: Carbohydrate-responsive element-binding protein

Cidea : Cell Death Inducing DFFA Like Effector A

CIT : Cold-induced thermogenesis

CK : Cellules de kupffer

CK18: Cytokératine 18

CPT1: Carnitine palmitoyltransférase I

CXCL10 : Chimiokine 10 à motif C-X-C

CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1

CYP7A1: Cytochrome P450 7A1

DAG : Diacylglycérol

DAMPs : Damage Associated Molecular Pattern

DC : Cellules dendritiques

DCA : Acide deoxycholique

DEN : Diethylnitrosamine

DGAT : Diacylglycérol acyltransférase

DMA : Diméthylamine

DNL : Lipogénèse de novo

DT2: Diabète de type 2

EASD: European Association for the Study of Diabetes

EASL : European Association for the Study of the Liver

EASO: European Association for the Study of Obesity

ELF-test: Enhanced liver fibrosis test

EMA : European Medicines Agency

FABP : Fatty acid binding protein

FADS1: Fatty Acid Desaturase 1

FAS : Fatty acyl synthase

Fas-L : Ligand de Fas

FATP: Fatty acid transport protein

FDA: Food & Drug Administration

FFA : Acides gras libres

FGF21: fibroblast growth factor 21

FIAF: Fasting-induced adipose factor

FMT: Transplantation fécale de microbiote

FNDC5: Fibronectin type III domain-containing 5

FOS : Fructo-oligosaccharides

FXR: Farnesoid X receptor

G3P: Glycérol-3-phosphate

GALT :Gut-associated lymphoïd tissues

GCKR : Glucokinase regulatory protein

GCLC/GCLM: Glutamate-cystéine ligase

GGT: Gamma glutamyl-transpeptidase

GLP-1 : Glucagon-like peptide 1

GOAT: Ghrelin-o-acyltransferase

TCF7L2: Transcription Factor 7 Like 2

GOS : Galacto-oligosaccharides

GPAT : G3P-acyltransférase

GPR41/43: Récepteurs couples aux protéines G 41/43

HFD: High fat diet

HFHFD : High fat high fructose diet

HMGCoA : Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A

HSC : Cellules stellaires hépatiques

IgA : Immunoglobuline A

IL-10 : Interleukine 10

IL-13 : Interleukine 13

IL1-β : Interleukine 1-β

IL-4 : Interleukine 4

IL-6 : Interleukine 6

ILC : Cellules lymphoïdes innées

IMC : Indice de masse corporelle

IPP : Inhibiteur de la pompe à protons

IR: Insulinorésistance

IRS1: Insulin receptor substrate 1

IRTK : Récepteur à l'insuline à activité tyrosine kinase

JAM : Jonctions moléculaires adhérentes

JNK : Kinases c-Jun N-terminales

KLF6: Kruppel Like Factor 6

KO: Knock-out

LDL: Low density protein

LPA: Acide lysophosphatidique

LPIN1: Lipine 1

L-PK : L-pyruvate kinase

LPL: Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharide

LXR: Liver receptor X

Lymphocytes Th : Lymphocytes T helper

MAFLD: Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease

MCD : Régime déficient en méthionine et en choline

MCP : Pectine de citron modifiée

MCT1 : Transporteur de monocarboxylate 1

MEC: Matrice extra-cellulaire

MI: Microbiote intestinal

MTTP: Microsomal triglyceride transfer protein

MUC-2 : Mucine 2

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease

NAS: NAFLD activity score

NASH: Non-alcoholic steatohepatitis

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural killer

NKT : Natural killer T

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NR1H2: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2

N-SMase : Neutral sphingomyélinase

OCA : Acide obéticholique

PA : Acide palmitique

PAMPS : Pathogen associated molecular patterns

PDH : Pyruvate déshydrogenase

PEG : Polyéthylène glycol

PEMT: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase

PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptors gamma coactivator 1-alpha

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIIINP: Amino-Terminal Propeptide of Type III Procollagen
PKC : Protéine kinase C
PNPLA3: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors
PRDM16 : PR/SET domain 16
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
PUFAs : Acides gras poly-insaturés
PYY : Peptide YY
RE : Réticulum endoplasmique
REG : Regenerating islet-derived protein
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
SAF: Stéatose activité fibrose
SAMe : S-adenosyl methionine
SCD1: Stearoyl-CoA desaturase-1
SCFAs : Acides gras à chaîne courte
SEP : Sclérose en plaques
SFB : Segmented Filamentous Bacteria
SHP-2 : Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2
SIBO: Small intestinal bacterial overgrowth
SLC27A5: Solute Carrier Family 27 Member 5
SLC2A1: Solute carrier family 2 member 1
SOD2: Superoxide Dismutase 2
SPT : Sérine palmitoyl-CoA transferase
SREBP: Sterol regulatory element-binding proteins

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
TA : Tissu adipeux blanc
TAMs : Tumor-associated macrophages
TG: Triglycérides
TGFβ : Transforming growth factor beta
TGR5: Takeda G Protein-coupled Receptor 5
TIMP-1 : Inhibiteur de métalloprotéinase 1
TLR: Toll-like receptor
TM6SF2: Transmembrane 6 superfamily 2
TMA : Triméthylamine
TMAO : Oxyde de triméthylamine
TNFα : Tumor necrosis factor alpha
TRAIL: Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
UCP1: Mitochondrial Uncoupling Protein
UDCA : Acide ursodéoxycholique
UFC : Unité formant colonie
UPR : Unfolded protein response
VHB: Virus de l'hépatite B
VHC: Virus de l'hépatite C
VLDL : Very low density protein
WT : Wild type
Xu5p: Xylulose 5-phosphate
ZO-1 : Zonula occludens 1

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
AVANT-PROPOS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	8
SOMMAIRE	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	17
REVUE DE LITTERATURE	20
Chapitre 1: LA STEATOPATHIE HEPATIQUE NON-ALCOOLIQUE.....	22
I. Histoire naturelle de la NAFLD	22
A. Le syndrome métabolique.....	22
B. Définition NAFLD/NASH	23
C. Histopathologie de la NAFLD.....	24
II. Epidémiologie.....	25
A. Données géographiques.....	25
B. Données liées à l'âge	27
C. Données liées au genre	28
D. Données liées à l'ethnie	28
III. Diagnostic.....	28
A. Diagnostic clinique	28
B. Gradation de la NAFLD/NASH	30
C. Classification étiologique de la NAFLD	31
IV. Impact économique	32
V. Prédications d'évolution de la NAFLD/NASH.....	33
A. Mortalité liée à la NAFLD/NASH	34
B. Transplantations hépatiques liées à la NAFLD	35
Chapitre 2 : PATHOGENESE DE LA NAFLD/NASH	37
I. Hypothèses liées à la pathogenèse de la NAFLD/NASH	37
II. Mécanismes impliqués dans la NAFLD/NASH	38
A. Métabolisme des glucides et insulino-résistance.....	38
1. Métabolisme du glucose en conditions physiologiques.....	38
2. Insulino-résistance dans la NAFLD.....	40
B. Métabolisme hépatique des lipides et lipotoxicité	47
1. Sources d'acides gras et absorption hépatique des lipides	47
2. Lipogenèse <i>de novo</i>	50
3. Oxydation des acides gras	52

4.	Formation des VLDL et exportation des triglycérides	54
5.	Lipotoxicité et impact du métabolisme lipidique dans la NAFLD	57
C.	Foie, inflammation et immunité dans la NAFLD.....	68
1.	Cellules de Kupffer	70
2.	Immunité innée et NAFLD	75
3.	Progression vers la fibrose et développement de la NASH.....	77
D.	Susceptibilité individuelle dans la NAFLD : rôle du polymorphisme génétique.....	78
1.	Polymorphisme génétique	78
2.	Microbiote intestinal	79
	Chapitre 3 : Implications des tissus adipeux dans la NAFLD.....	81
I.	Inflammation du tissu adipeux blanc	81
II.	Tissu adipeux brun et brunissement du TA.....	83
A.	Tissu adipeux brun.....	83
1.	Morphologie du BAT.....	84
2.	Fonctions du BAT.....	85
3.	Brunissement du tissu adipeux blanc.....	87
	Chapitre 4 : LE MICROBIOTE INTESTINAL	91
I.	Généralités	91
II.	Fonctions du MI.....	94
A.	Fonctions métaboliques du MI.....	94
B.	Fonction immunitaire	95
III.	Modifications du MI	95
A.	Impact de l'alimentation sur le MI	96
B.	Impact des médicaments	97
1.	Antibiotiques	97
2.	Autres médicaments	97
C.	Modifications par les fibres alimentaires	98
1.	Fibres alimentaires	98
2.	La pectine	99
3.	Sources de pectine	100
	Chapitre 5: IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA NAFLD/NASH	103
I.	Axe foie-intestin	103
II.	Intégrité de la barrière intestinale	104
A.	Composition de la barrière intestinale.....	104
1.	Barrière physique	104
2.	Barrière biochimique.....	107

3. Barrière immunitaire	108
B. Rôle de la barrière intestinale	109
III. Impact de la dysbiose intestinale dans la NAFLD	112
A. Impact du rôle du MI dans la prise de poids	112
B. Impact de l'implication du MI dans la NAFLD	113
1. Impact du MI dans le syndrome métabolique et dans la NAFLD	113
2. Qualité de la dysbiose au cours de la NAFLD	114
3. Rôle des métabolites bactériens	123
C. Interaction entre le microbiote intestinal et le tissu adipeux ; importance de l'axe tissu adipeux/intestin	140
D. Autres mécanismes	143
1. Implication de FIAF (fasting-induced adipose factor)	143
2. Pullulation microbienne au niveau de l'intestin grêle (SIBO, small intestinal bacterial overgrowth).....	143
CHAPITRE 6 : MODELES ANIMAUX DE LA NAFLD/NASH	147
I. Modèles utilisant un régime alimentaire particulier.....	148
A. Régime déficient en méthionine et en choline (MCD).....	148
B. Régime athérogénique	148
C. Supplémentation en fructose.....	149
D. Régimes riches en graisses dits « HFD (high fat diet) »	150
II. Modèles chimiques.....	151
A. Tétrachlorure de carbone (CCL ₄)	151
B. Diethylnitrosamine (DEN).....	152
III. Modèles génétiques	152
A. Modèles génétiques mimant un diabète de type 2	152
B. Autres modèles génétiques.....	153
IV. Transplantation fécale de microbiote intestinal	157
- Une FMT avec éradication préalable de l'écosystème de l'hôte via administration d'antibiotiques,	158
Chapitre 7: STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DE LA NAFLD/NASH.....	161
I. Mesures hygiéno-diététiques.....	161
II. Vitamines et supplémentation	162
A. Acides gras poly-insaturés (PUFAs)	162
B. Vitamine E	162
C. Resvératrol	162
III. Procédures chirurgicales	163
IV. Thérapeutique médicamenteuse	163

V. Modulation du MI comme piste thérapeutique.....	166
A. Utilisation des antibiotiques.....	166
B. Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques.....	166
C. FMT.....	170
PROJET DE THESE	173
RESULTATS	176
I. Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses.....	177
II. Résultats complémentaires : Impact de la pectine à haute dose sur les lésions hépatiques induites par un régime enrichi en graisse, en sucre et en cholestérol.....	211
III. Discussion de l'article et des données complémentaires	217
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	224
ANNEXES.....	231
I. Microbiote intestinal et stéatohépatite non-alcoolique : Revue de littérature	232
II. Hépatotoxicité des inhibiteurs de tyrosine kinase : Revue de littérature	263
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	315

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Arbre décisionnel de la MAFLD selon des critères diagnostiques « positifs»; d'après Eslam et al., 2020 ⁶	24
Figure 2 : Spectre des lésions dans la NAFLD; d'après Sherif et al., 2019 ⁹	25
Figure 3: Prévalence de la NAFLD dans le monde; d'après Younossi et al., 2019 ⁵	27
Figure 4: Pathogenèse « multi-hits » de la NAFLD; d'après Xu et al., 2019 ³¹	38
Figure 5: Signalisation insulinique en conditions physiologiques; d'après Samuel et al., 2016 ³⁷	39
Figure 6: Insulinorésistance musculaire; d'après Samuel et al., 2016 ³⁷	41
Figure 7: Insulino-résistance dans le tissu adipeux; d'après Samuel et al., 2016 ³⁷	43
Figure 8: Insulinorésistance hépatique; d'après Samuel et al., 2016 ³⁷	44
Figure 9: Schéma général de l'insulinorésistance et des interactions entre le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique; d'après Mu et al., 2019 ³⁶	45
Figure 10: Mécanisme moléculaire par lequel un excès en diacylglycérol entraîne le développement de l'insulino-résistance hépatique et l'hyperglycémie; d'après Perry et al., 2014 ⁵³	47
Figure 11: Sources majeures de lipides dans le foie en fonction de l'état nutritionnel; d'après Alves-Bezerra et al., 2019 ⁴³	49
Figure 12: Schéma de la lipogenèse de novo	50
Figure 13: Contrôle transcriptionnel des voies de la glycolyse et de la lipogenèse.	52
Figure 14: β -oxydation mitochondriale des acides gras; d'après Houten et al., 2016 ⁴⁹	54
Figure 15: Formation des triglycérides hépatiques; d'après Alves-Bezerra et al., 2016 ⁴³	55
Figure 16: Synthèse des VLDL; d'après Jiang et al., 2013 ⁵¹	56
Figure 17: Métabolisme hépatique des lipides ; d'après Mota et al., 2019 ⁵⁶	57
Figure 18: Mécanismes global de la lipotoxicité; d'après Alkhoury et al., 2009 ⁵⁸	58
Figure 19: Lipogenèse de novo et NAFLD; d'après Alves-Bezerra et al., 2019 ⁴³	59
Figure 20: Accumulation d'espèces lipotoxiques et impact sur la progression de la NAFLD; d'après Marra et al., 2018 ⁵⁵	61
Figure 21: Rôles des céramides, des acides gras saturés et du cholestérol libre dans l'apoptose et la NAFLD; d'après Alkhoury et al., 2018 ⁵⁸	63
Figure 22: Altération du réticulum endoplasmique (RE) et de la mitochondrie dans la NAFLD; d'après Svegliati-Baroni et al., 2019 ⁴⁶	66
Figure 23: Mécanismes croisés de la lipotoxicité et de la glucotoxicité dans la pathogenèse de la NAFLD; d'après Chao et al. 2019 ³³	67
Figure 24: Composition des cellules immunitaires dans le foie; d'après Racanelli et al., 2006 ⁶³	69
Figure 25: Localisation des cellules dans le parenchyme hépatique; d'après Doherty et al., 2016 ⁶²	69
Figure 26: Polarisation des macrophages; d'après Kazankov et al., 2019 ³⁹	70
Figure 27: Implication de la voie CCR2 et CCR5 dans le développement de l'inflammation, d'après Kitade et al., 2017 ³⁰	72
Figure 28: Rôle des Toll-like receptors (TLR) dans la NAFLD; d'après Roh et al., 2013 ⁶⁸	74
Figure 29: Activation des macrophages hépatiques dans la NASH; d'après Kazankov et al., 2019 ³⁹	75
Figure 30: Cellules inflammatoires et immunitaires influant l'activation des cellules stellaires hépatiques; d'après Lee et al., 2015 ⁷¹	77
Figure 31: Modelage du tissu adipeux; d'après Kahn et al., 2019 ³⁸	82
Figure 32: Hétérogénéité des tissus adipeux chez l'Homme; d'après Kahn et al., 2019 ³⁸	84

Figure 33: Structure du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc; d'après Nishimoto et al. 2017 83	85
Figure 34: Différences morphologiques entre les tissus adipeux blanc, beige et brun; d'après Kwok et al., 2016 ⁹⁸	88
Figure 35: Brunissement du tissu adipeux, d'après Lee et al., 2019 ⁹⁹	89
Figure 36: Répartition spatiale du MI chez l'Homme; d'après Kovatcheva-Datchary, 2015 ¹³³	92
Figure 37: Arbre phylogénétique représentant les groupes dominants du microbiote intestinal chez l'homme et dans le modèle murin; d'après Spor et al., 2011 ¹⁰⁹	93
Figure 38: Taxonomie bactérienne. Exemple des Proteobacteria	93
Figure 39: Fonctions du microbiote intestinal	94
Figure 40: Axe foie-intestin; d'après Tripathi et al., 2018 ¹⁶⁷	103
Figure 41: Les quatre composantes de la barrière intestinale, d'après Natividad et al., 2013 ¹⁶⁸ ...	104
Figure 42 : Anatomie de la muqueuse intestinale dans l'intestin grêle et le côlon, d'après Allaire et al., 2018 ¹⁷²	106
Figure 43: Jonctions serrées ; d'après Hammer et al., 2015 ¹⁷³	107
Figure 44: Physiologie de la barrière intestinale d'après Peterson et al., 2014 ¹⁷⁸	109
Figure 45: Maintien de l'intégrité de la barrière intestinale d'après Tilg et al., 2019 ¹⁸²	112
Figure 46: Mécanismes croisés des acides gras à chaîne courte dans la régulation de l'homéostasie métabolique; d'après Canfora et al., 2015 ²²⁵	124
Figure 47: Impact des acides gras à courte chaîne dans le tissu adipeux, d'après Canfora et al., 2015 ²²⁵	128
Figure 48: Action des acides gras à courte chaîne sur le métabolisme du muscle, d'après Canfora et al., 2015 ²²⁵	129
Figure 49: Les acides gras à chaîne courte régulent le métabolisme des lipides et du glucose via des réactions croisées inter-organes à travers l'activation de l'AMPk dans le foie et dans le muscle; d'après Tunngland et al., 2018 ²²⁶	130
Figure 50: Rôle des SCFAs dans le métabolisme hépatique d'après Canfora et al., 2015 ²²⁵	131
Figure 51: Acides gras à chaîne courte et NAFLD, d'après Chu et al., 2018 ¹⁸³	134
Figure 52: Implication des acides biliaires dans la NAFLD, d'après Chu et al., 2018 ¹⁸³	136
Figure 53: Implication de la choline et de ses métabolites dans la NAFLD; d'après Chu et al., 2018 ¹⁸³	138
Figure 54: Implication de l'éthanol dans la NAFLD, d'après Chu et al., 2018 ¹⁸³	139
Figure 55: Rôles des métabolites bactériens dans le développement de la NAFLD et de la NASH, d'après Xie et al., 2019 ²³⁶	140
Figure 56: Rôle du brunissement du tissu adipeux blanc (WAT) et de l'activation du tissu adipeux brun (BAT) dans la NAFLD, d'après Moreno-Navarrete et al. , 2019 ³⁵⁵	143
Figure 57: Impact de l'axe foie-intestin dans la pathogenèse de la NAFLD et potentiel thérapeutique des probiotiques d'après Meroni et al.; 2019 ³²⁰	144
Figure 58: Récapitulatif de la pathogenèse de la NASH, d'après Kook Hwan Kim et al., 2018 ³²	145

TABLEAUX

Tableau 1: Qualité de la dysbiose dans la NAFLD, la NASH et la fibrose (1/3).....	120
Tableau 2: Fonctions des acides gras à chaîne courte dans la NAFLD	133
Tableau 3: Modèles animaux de la NAFLD et de la NASH (1/2).....	155
Tableau 4: Stratégies thérapeutiques médicamenteuses dans la NAFLD et dans la NASH	165

REVUE DE LITTERATURE

Chapitre 1: LA STEATOPATHIE HEPATIQUE NON-ALCOOLIQUE

I. Histoire naturelle de la NAFLD

A. Le syndrome métabolique

L'obésité et le syndrome métabolique se répandent drastiquement dans l'ensemble des pays, indépendamment de leur statut d'industrialisation et la prise en charge de ces pathologies et de leurs complications constituent des enjeux prioritaires des acteurs de santé dans le monde.

Si l'indice de masse corporelle (IMC), calculé en divisant le poids d'un individu par le carré de sa taille, a longtemps servi d'indicateur pour évaluer le surpoids et l'obésité, la Fédération Internationale du Diabète a actualisé en 2006 la définition du syndrome métabolique qui se réfère non pas à une pathologie unique mais à une association de facteurs de risques métaboliques et/ou cardiovasculaires. On fera référence au syndrome métabolique chez tout patient présentant soit un tour de taille > 94cms chez les hommes et > 80 cms chez les femmes et au moins deux des critères suivants :

- Glycémie plasmatique à jeun > 5,6 mmol/L ou un diabète de type 2 diagnostiqué ;
- Un taux de HDL cholestérol < 1,0 mmol/L (40mg/dL) chez les hommes et < 1,3 mmol/L (50 mg/dL) chez les femmes ou la prise d'un traitement hypocholestérolémiant ;
- Un taux de triglycérides plasmatiques > 1,7 mmol/L (150 mg/dL) ou la prise d'un traitement contre l'hypertriglycéridémie ;
- Une pression artérielle > 130/85 mmHg ou la prise d'un traitement contre l'hypertension artérielle.

Une autre définition du syndrome métabolique existe et exclue le tour de taille dans les critères d'évaluation de la pathologie. En 2009, la Fédération Internationale du Diabète et l'Institut National de la Santé aux Etats-Unis ont essayé de lier les multiples définitions du syndrome métabolique. Les deux entités savantes s'accordent sur le fait que l'obésité soit un des 5 facteurs pré-requis pour le diagnostic et que la présence de 3 de ces critères suffise à définir un syndrome métabolique, excluant alors le tour de taille comme composante obligatoire de ce syndrome. Ceci explique notamment l'absence du diagnostic d'obésité chez certains patients présentant par ailleurs les autres critères de la pathologie ; et la difficulté d'établir des valeurs seuils homogènes pour l'obésité abdominale en fonction du genre des

patients, de leur âge mais également de leur localisation géographique¹. Des valeurs limites de circonférence abdominale ont été proposées en fonction du sexe des patients et de leur origine mais sont régulièrement réévaluées dans la littérature.

L'incidence du syndrome métabolique suit de près celle de l'obésité et du diabète de type 2 et on estime qu'un quart de la population mondiale serait concerné par le syndrome métabolique.²

B. Définition NAFLD/NASH

La maladie non-alcoolique du foie dite NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Elle suit une définition dite « négative » en reposant sur un diagnostic d'exclusion. On fait référence à une NAFLD lorsqu'il y a accumulation supérieure ou égale à 5% de gouttelettes lipidiques dans le foie en dehors de toute autre cause pouvant expliquer cette stéatose hépatique telles que la consommation d'alcool, une infection virale ou la prise de médicaments stéatogéniques³.

La stéatohépatite non-alcoolique ou NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis) est une complication de la NAFLD qui associe à la définition de base un caractère inflammatoire et dans ses formes les plus avancées une fibrose d'intensité variable voire une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire⁴.

La NAFLD est un terme générique qui regroupe un large spectre de manifestations hépatiques allant de la stéatose bénigne et réversible à des atteintes plus sévères comme la cirrhose hépatique ou le carcinome hépatocellulaire (CHC). La pathologie progresse généralement lentement avec une moyenne de 7,7 ans entre chaque étape de la maladie⁵. On estime qu'environ 25% des patients NAFLD évolueront vers une NASH. A terme, 25% des patients NASH développeront une cirrhose qui se compliquera pour 2% d'entre eux en CHC.

En fonction du stade de la NAFLD, les éléments histopathologiques diffèrent et signent la gravité de l'atteinte hépatique.

Une nouvelle définition tend à s'installer sous le terme de MAFLD (Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease) avec la volonté de proposer un terme non plus avec des critères

d'exclusion mais au contraire dits « positifs » prenant en compte l'hétérogénéité clinique de la pathologie⁶. La MAFLD est définie par la présence d'une stéatose hépatique associée à l'un des 3 critères suivants⁶ :

- Surpoids/obésité ;
- Présence d'un diabète de type 2 (DT2) ;
- Dysrégulation métabolique.

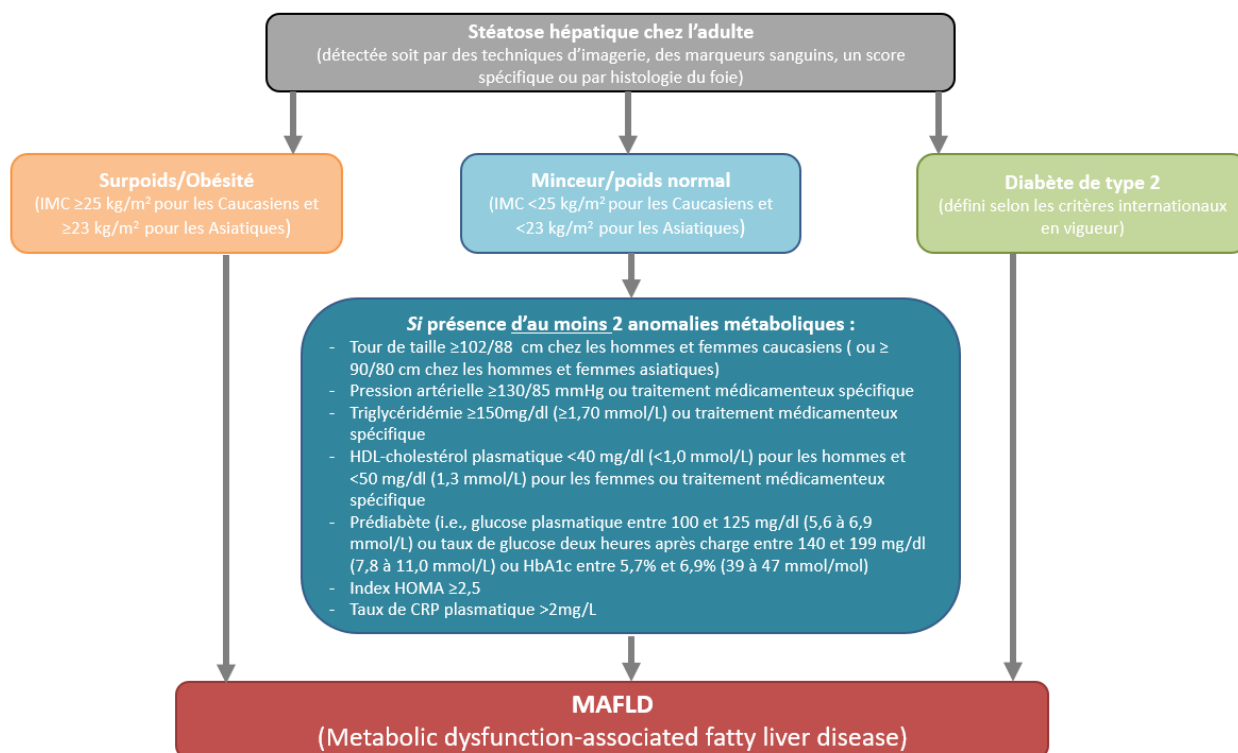


Figure 1 : Arbre décisionnel de la MAFLD selon des critères diagnostiques « positifs»; d'après Eslam et al., 2020⁶

C. Histopathologie de la NAFLD

Au stade primaire, la NAFLD se définit par une accumulation de plus de 5% de lipides dans le foie. Les lipides, majoritairement des triglycérides (TG), sont stockés au sein des hépatocytes sous forme de gouttelettes. La stéatose peut être de deux types :

- macrovésiculaire et correspond alors à une large goutte de lipides structurellement bien définie qui vient occuper le cytoplasme des hépatocytes en repoussant leur noyau à la périphérie ;

- microvésiculaire, dans ce cas le cytoplasme hépatocytaire est rempli d'une myriade de microgouttelettes lipidiques et conserve un noyau central. On parle de cellule spongiocytaire.

Si la NAFLD est principalement une forme de stéatose macrovésiculaire, 10% des patients présenteront une forme microvésiculaire ⁷.

Dans la NASH on observe une inflammation hépatique intralobulaire le plus souvent légère, caractérisée par la présence d'infiltrats inflammatoires variés : cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie), éosinophiles, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles... Dans les formes les plus sévères, une ballonnisation des hépatocytes peut être observée, ces derniers prenant une forme « gonflée » signe de leur dégénérescence. Un des éléments caractéristiques de la progression de la NASH est le développement d'une fibrose hépatique, majoritairement péri-cellulaire. Le foie s'épaissit et voit sa fonction s'altérer⁸. La fibrose peut s'aggraver conduisant dans certains cas à l'avènement d'une cirrhose qui peut évoluer vers le CHC nécessitant parfois une transplantation hépatique quand celle-ci est possible⁹.

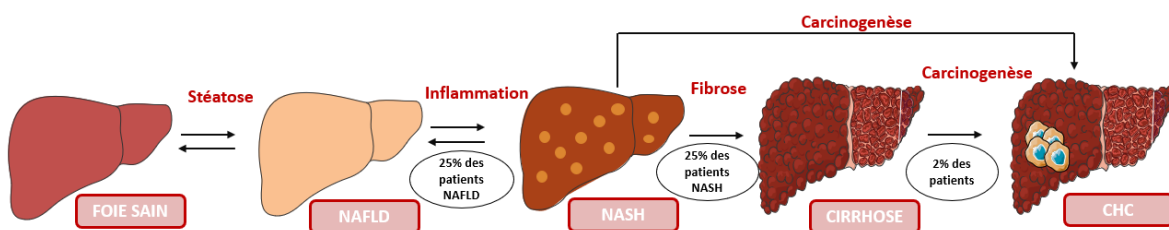


Figure 2 : Spectre des lésions dans la NAFLD; d'après Sherif et al., 2019 ⁹

Un régime gras va induire le développement d'une stéatose simple réversible. Lorsqu'une inflammation accompagne la stéatose on parle de NASH. A terme, l'inflammation hépatique évolue vers une fibrose entraînant une cirrhose du foie. Les cas les plus graves évoluent vers un carcinome hépatocellulaire (CHC).

II. Epidémiologie

A. Données géographiques

La NAFLD est en constante augmentation dans le monde, parallèlement à l'épidémie d'obésité. Les différentes études épidémiologiques internationales (HEPAHEALTH, NHANES) s'accordent à dire qu'environ 25% de la population globale présente une NAFLD et que 3 à 5% de la population mondiale présente une NASH. En France, l'étude CONSTANCES estime que la NAFLD concerne 1 français sur 6 et que parmi ces patients 2,6% présentent une NASH ¹⁰.

Ces tendances épidémiologiques générales sont modulées selon des critères géographiques et diagnostics.

Sur le continent américain, il semblerait que les pays sud-américains soient plus impactés par la NAFLD que les Etats-Unis. Ainsi un diagnostic de NAFLD est posé pour 24% de la population aux USA contre 30,45% de la population sud-américaine. Des disparités inter-pays au sein d'une même région sont également constatées : à titre d'exemple, la NAFLD concerne 23% des adultes au Chili contre 13% au Pérou.

En Asie, on constate une augmentation drastique des cas de NAFLD en lien avec l'urbanisation des populations, ce changement de mode de vie s'accompagnant de l'installation d'une sédentarité et d'une suralimentation. Ainsi 25% de la population asiatique est suspectée d'être atteinte de NAFLD. En Chine les données épidémiologiques révèlent que l'incidence de la stéatose hépatique métabolique a doublé en 20 ans et concerne 15% de la population. Une évolution semblable est notée au Japon où 29,7% de la population serait atteinte de NAFLD. Les pays de l'Asie du Sud suivent la même tendance avec une nette disparité entre les populations rurales et les populations urbanisées. En Inde par exemple, la NAFLD est d'environ 9% pour les populations rurales contre quasiment 33% pour les populations urbanisées réaffirmant ainsi l'impact du mode de vie sur l'avènement de cette pathologie⁸.

En Europe, les tendances épidémiologiques sont similaires : approximativement 23,71% de la population européenne globale présenterait une NAFLD¹¹. Un gradient Nord-Sud apparaît avec une prévalence plus importante de la pathologie dans les pays du Sud de l'Europe.

En Australie, la NAFLD est la première maladie hépatique du pays et concerne 20 à 30% de la population alors qu'elle n'affecte que 13% de la population de Nouvelle-Zélande.

Enfin les pays du Moyen-Orient et ceux d'Afrique du Nord suivent les mêmes tendances avec une prévalence comprise entre 20 et 30%. Peu de données restent disponibles quant à la prévalence de la NAFLD pour les pays d'Afrique centrale.

L'analyse des données géographiques sur la NAFLD corrèle facilement avec l'explosion de l'obésité et du diabète de type 2 au niveau mondial et reflète les changements d'habitudes

alimentaires et de vie des populations. L'incidence réelle de la NAFLD à travers le monde reste cependant difficile à évaluer précisément du fait de difficultés diagnostiques.

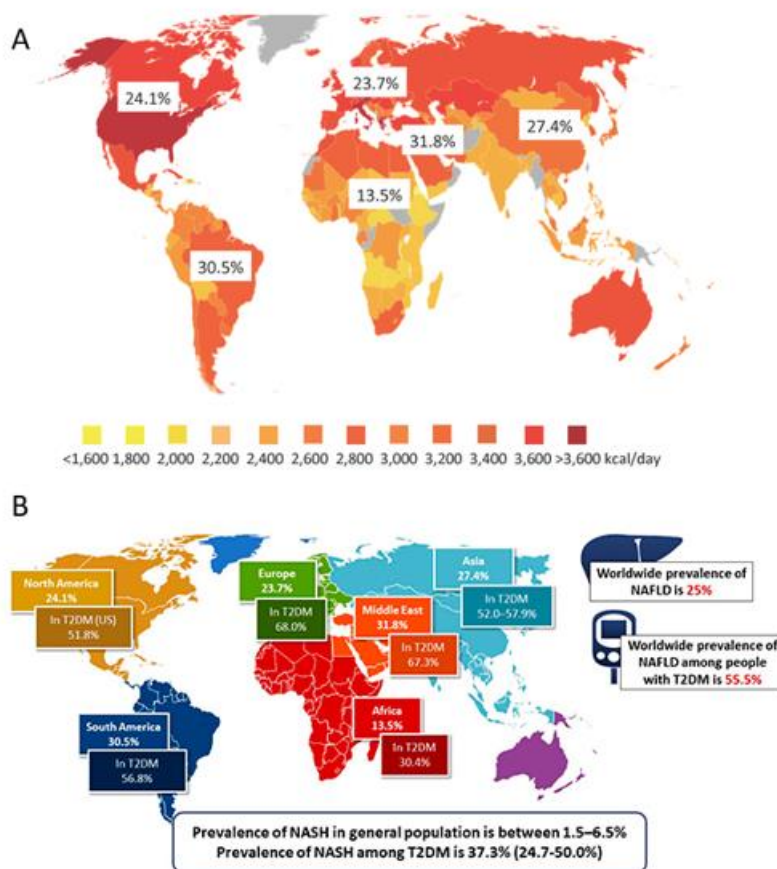


Figure 3: Prévalence de la NAFLD dans le monde; d'après Younossi et al., 2019⁵
La NAFLD évolue en parallèle de l'épidémie d'obésité (A) et du diabète de type 2(B).

B. Données liées à l'âge

L'âge revêt une importance particulière dans l'évolution de la stéatose hépatique non-alcoolique. Une étude menée sur plus de 300 patients de tranches d'âge différentes montre ainsi une augmentation de l'incidence de la NAFLD chez les patients âgés de plus de 60 ans mais également une augmentation de la fibrose et de l'occurrence de la NASH⁸. Ceci s'explique notamment par l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 dans les populations plus âgées.

Une des inquiétudes majeures des professionnels de santé concerne l'augmentation de la NAFLD dans la population pédiatrique. Une étude évaluant l'évolution de la pathologie entre 1975 et 2016 a mis en évidence une augmentation de 0,7% à 5,6% chez les filles et une évolution de 0,9% à 7,8% chez les garçons¹². Cette évolution de l'incidence de la NAFLD chez

les enfants est fidèlement corrélée à l'augmentation drastique de l'obésité infantile et est extrêmement préoccupante compte tenu du fait que la détection d'une obésité et d'une atteinte hépatique à l'enfance est un facteur majeur de risque de développement de complications à l'âge adulte dont l'apparition d'une cirrhose voire d'un CHC ¹³.

C. Données liées au genre

L'analyse des données épidémiologiques de la NAFLD et de la NASH révèle des disparités liées au sexe des patients. Les résultats des études restent cependant controversés. Ainsi, si on se base sur les données obtenues sur des cohortes issues des Etats-Unis, de Chine et d'Europe il apparaît que la prévalence de la NAFLD est similaire jusque 20 ans pour les deux sexes puis tend à être plus importante pour les hommes que pour les femmes avec l'âge ⁸. Au contraire, certaines études menées sur la population asiatique montrent des résultats inverses avec une tendance à l'augmentation des cas de NAFLD pour le sexe féminin ¹⁴.

D. Données liées à l'ethnie

De la même manière qu'il a été démontré une disparité de prévalence de la NAFLD suivant les pays au sein d'un même continent, des données mettent en évidence l'existence de différences ethniques entre les populations. Ainsi il s'avère que les patients les plus touchés par la NAFLD sont d'origine hispanique puis des patients caucasiens non-hispaniques. Les populations les moins enclines à développer une NAFLD seraient les afro-américains (10% des patients). Ces disparités ethniques découleraient de polymorphismes génétiques spécifiques et de l'incidence de facteurs environnementaux ⁸.

III. Diagnostic

A. Diagnostic clinique

Le diagnostic de NAFLD est souvent révélé au cours d'un dépistage systématique, la maladie évoluant le plus souvent de manière silencieuse ce qui suggère une sous-estimation de son incidence réelle.

Le diagnostic de NAFLD reste un diagnostic d'exclusion et toute autre pathologie hépatique qui pourrait répondre aux anomalies détectées par imagerie ou après découverte d'une fonction biologique hépatique altérée se doit d'être écartée (hépatite virale, auto-immune, alcoolique ou induite par des toxiques)¹⁵. Aux premiers stades de la maladie, la plupart des patients ne montre aucune altération des paramètres hépatiques et les transaminases, marqueurs de la cytolyse hépatique, peuvent être normales¹⁶. Certains symptômes aspécifiques peuvent être présents. D'autres dépendent du stade de la maladie (asthénie, prurit, hepato-splénomégalie, ascite, œdème, alopécie...) ¹⁷.

Le diagnostic primitif de la NAFLD s'établit souvent par des techniques d'imagerie (échographie, IRM ou CT-scan) qui mettent en évidence une stéatose. Les techniques d'imagerie actuelles ne permettent pas de se prononcer précisément sur la sévérité de la fibrose et ne permettent pas de déterminer l'état d'avancement de la pathologie. De plus pour l'échographie, la stéatose n'est détectable que lorsqu'elle est supérieure à 30%.

Le diagnostic de NASH peut nécessiter des méthodes invasives permettant d'apprécier le degré de la fibrose hépatique. La biopsie hépatique apporte ainsi des indications sur l'état inflammatoire du foie, sur la morphologie des hépatocytes, sur la stéatose, sur la nécrose et sur l'organisation générale du foie permettant de grader la fibrose^{15, 16}. Bien que constituant le moyen le plus adéquat et le plus fin pour évaluer la pathologie, la biopsie hépatique est uniquement indiquée chez les patients NAFLD étiquetés comme étant à haut risque de développer une NASH ou suspectés de présenter des maladies hépatiques chroniques concomitantes ¹⁶.

Malgré l'évolution des techniques d'imagerie, la biopsie hépatique reste actuellement la méthode de référence pour établir un diagnostic de NASH et déterminer le stade de la pathologie. Du fait des risques liés à cet acte diagnostique et de l'évolution des cas de NAFLD, un des enjeux majeurs réside dans la mise au point de biomarqueurs spécifiques et sensibles permettant un diagnostic fiable et non invasif de la pathologie, utilisable à grande échelle de manière reproductible. Certains algorithmes tels que le Fibrotest® permettent d'avoir une idée du stade de fibrose et ont constitué une avancée majeure dans le diagnostic des patients NASH. Plusieurs pistes sont à l'étude qui pourraient permettre d'évaluer l'activité de la pathologie à tous ses stades. Parmi eux on retrouve les marqueurs de mort cellulaire et

d'apoptose tels que les fragments de cytokératine 18 (CK18) composants structurels de l'hépatocyte et retrouvés chez les patients NASH. Par ailleurs, le dosage d'adipocytokines impliquées dans le développement de la NASH (adiponectine, ghreline, interleukine-6...) pourrait permettre d'affiner l'évaluation du stade de la NASH, leur taux circulant étant étroitement corrélé avec la sévérité de la pathologie¹⁸. Enfin des espoirs sont placés dans les approches « OMICS » où l'utilisation de la génomique, de la transcriptomique, de l'épigénomique et les analyses métabolomiques et protéomiques pourraient permettre de définir une signature de la maladie. Différents modèles sont à l'étude et se basent sur le dosage des acides gras polyinsaturés¹⁹, sur les taux circulants de glutamate, de taurine et de lactate ou sur les dosages de métabolites issus des lipides²⁰.

B. Gradation de la NAFLD/NASH

Les différents stades de la NAFLD sont évalués et gradés en fonction des éléments histologiques observés dans le foie. L'évaluation du stade de la pathologie prend en compte la stéatose, la présence de fibrose et les signaux inflammatoires présents *in situ*.

Concernant l'inflammation hépatique, trois stades apparaissent en fonction du degré de la stéatose hépatocellulaire, de la ballonnisation des hépatocytes et de leur désorganisation, ainsi que du type d'inflammation observée (lobulaire ou périportale). Le stade 1 correspond à un état nécro-inflammatoire léger tandis que le stade 3 est considéré comme sévère.

L'état de fibrose du foie est un élément essentiel dans l'évaluation de la gravité de la maladie hépatique. On distingue 4 stades (F1 à F4), le stade 4 correspondant à un état cirrhotique.

Plusieurs scores prenant en compte des paramètres physiologiques, histologiques et biologiques sont utilisés pour grader la pathologie^{15 16 7}.

- Le NAFLD activity score (NAS) instauré en 2005 par Kleiner et Brunt, s'appuie sur la quantité de stéatose, la présence d'une ballonnisation des hépatocytes et le degré d'inflammation hépatique²¹. La somme des trois entités détermine un score de 0 à 8 où 8 est le stade le plus avancé de la pathologie. La fibrose est évaluée à part en 7 stades (0,1A,1B,1C,2,3,4).

- Le SAF (Stéatose Activité Fibrose) mis en place en 2012 par Bedossa évalue indépendamment les facteurs impliqués dans la maladie à savoir la stéatose (0 à 3), l'activité c'est-à-dire l'inflammation hépatique (0 à 2) + la ballonnisation des hépatocytes (0 à 2) et la fibrose (0 à 4)²².

Nous verrons plus loin que la stéatose pourrait paradoxalement se révéler protectrice dans la pathologie et lorsqu'elle est pure, empêcher le développement de la fibrose, ce qui justifie la classification proposée par Bedossa.

De nouveaux algorithmes qui se fondent soit sur des données cliniques tels que le Fibrotest® ou l'Hepascore®, soit sur des données plasmatiques comme le ELF test® ou le Fibrometre® sont également employés. Le Fibrotest® permet de diagnostiquer une fibrose avancée chez les patients NAFLD mais sa performance diagnostique est réduite en présence de certains éléments interférents comme une inflammation aiguë, un sepsis ou une cholestase extra-hépatique. L'Hepascore® est un algorithme largement utilisé dans la détection de la fibrose lors de maladies hépatiques chroniques et combine des variables cliniques telles que l'âge, le genre et des données biologiques dont la bilirubine et le taux de GGT. L'ELF test® (enhanced liver fibrosis) inclut lui des données relatives au taux de procollagène de type III (PIIINP) et à l'inhibiteur de métalloprotéinase 1 (TIMP-1). Sa performance est affectée par le genre et l'âge et son efficacité dans la NAFLD reste à prouver¹⁸. Enfin le Fibromètre® est un test sanguin dont la précision diagnostique est reconnue chez les patients avec une fibrose avancée. L'intérêt de ces scores fondés sur la mesure de biomarqueurs sériques réside dans le fait que ce sont des tests non-invasifs, quantitatifs et reproductibles où l'on s'affranchit du biais induit par l'opérateur. Ils présentent cependant des lacunes dont un manque de spécificité hépatique et des interférences ne permettant pas une précision optimale de diagnostic. Ainsi, leur intérêt semble plutôt résider dans l'orientation des hypothèses diagnostiques et dans le suivi, que dans le diagnostic lui-même¹⁸.

C. Classification étiologique de la NAFLD

Les lignes directrices émises par les organisations expertes EASL (European Association for the Study of the Liver), EASD (European Association for the Study of Diabetes), EASO (European Association for the Study of Obesity) et AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) proposent une classification de la NAFLD/NASH en fonction de son origine étiologique.

REVUE DE LITTÉRATURE : *La stéatopathie hépatique non-alcoolique*

Les NAFLD/NASH primaires désignent les stéatoses dont l'origine découle de troubles métaboliques tels que l'obésité, le DT2, les dyslipidémies et dans ce cas, souvent associées à une insulino-résistance. Parmi les NAFLD/NASH primaires certaines ne présentent pas d'altération de la tolérance au glucose et sont soit la conséquence de polymorphismes génétiques soit d'origine indéterminée et dites « cryptogéniques ».

Les NAFLD/NASH secondaires comprennent les stéatoses hépatiques associées à des troubles endocriniens (syndrome des ovaires polykystique, hypothyroïdie...), à la consommation de médicaments stéatogéniques (glucocorticoïdes, amiodarone, méthotrexate, tamoxifène...) ou à des actes hospitaliers comme la nutrition parentérale. Elles impliquent également les maladies stéatotiques du foie d'origine virale ou auto-immune^{3, 16}.

Si la NAFLD est une complication attendue de l'obésité et du syndrome métabolique, on dénote également l'apparition de la maladie chez des patients présentant un IMC normal. C'est ce que l'on nomme la « lean NAFLD ». Aux USA on estime que 7% des patients présentent une « lean NAFLD », mais la prévalence reste surtout importante dans les régions rurales d'Asie où elle concernerait 25% à 30% de la population²³⁻²⁵. Bien que considérée au départ comme moins impactante que la NAFLD classique, des rapports plus récents affirment que la « lean NAFLD » qui atteint majoritairement des patients jeunes, entraînerait une plus forte morbi-mortalité avec un temps de survie diminué notamment en cas de transplantation hépatique, et ce malgré un profil métabolique plus sain que celui des patients NAFLD classiques.

IV. Impact économique

De par ses comorbidités associées, l'explosion des cas de NAFLD se révèle un enjeu majeur de santé publique au regard des contraintes économiques qui lui sont associées. L'impact économique de la NAFLD et de la NASH est principalement lié au coût de santé induit par la prise en charge des traitements associés à la maladie en elle-même ou à ses complications. Aux USA, il a été estimé que le coût total annuel de soin d'un patient NAFLD sans assurance privée était en moyenne de 8000 dollars en diagnostic primaire et d'environ 3500 dollars pour une prise en charge à long-terme tandis que pour des patients présentant les mêmes comorbidités mais sans NAFLD le coût de prise en charge était en moyenne de 2300 dollars.

La prise en charge d'un patient NAFLD implique des actes d'imagerie, des biopsies et des périodes d'hospitalisation extrêmement coûteuses⁸.

Aux USA, il est prédit une dépense annuelle de 62 milliards de dollars dans les années futures en prenant en compte l'augmentation des cas de NAFLD soit environ 39 millions de personnes. Cette dépense annuelle s'élèverait en Europe à 19 milliards de dollars pour la prise en charge d'environ 30 millions de patients. De même il a été évalué que les complications associées à l'évolution de la pathologie (fibrose, cirrhose, CHC) s'accompagnaient d'une augmentation des coûts de prise en charge ; ces derniers étant estimés à 910 milliards de dollars sur 10 ans.

Par ailleurs, des études portant sur la qualité de vie des patients NAFLD mettent en avant que plus de 27% des patients présentent une dépression, soit 4 fois plus que les statistiques relatives à la population globale aux USA (6,7%). En plus des comorbidités classiques associées à la maladie hépatique s'ajoutent des comorbidités et des affections hors sphère hépatique mais qui nécessitent aussi une prise en charge coûteuse.

Enfin, outre les coûts de santé, liés à la prise en charge de la NAFLD et de ses complications, il est important de prendre en compte l'impact social des patients atteints de pathologies hépatiques chroniques. Une analyse conduite de 2004 à 2013 sur des patients souffrant de maladies hépatiques chroniques dont la NAFLD souligne que ces patients du fait de leur invalidité sont moins employés engendrant alors un autre type d'impact économique.

V. Prédications d'évolution de la NAFLD/NASH

L'incidence de la NAFLD dans la population générale suit étroitement celle de l'obésité et du diabète de type 2. Les projections réalisées via des outils de modélisation par les épidémiologistes laissent entendre que pour 2030, dans l'hypothèse d'une stabilisation du diabète et de l'obésité, l'augmentation des cas de NAFLD serait modeste (entre 0 et 30%). Néanmoins, l'évolution mondiale de la NASH serait d'environ 16%. La mortalité et la chronicité des maladies hépatiques sembleraient doubler en réponse au vieillissement concomitant de la population.

L'urbanisation de certains pays et en particulier de la Chine prédit une augmentation de la sédentarité des populations. Il est alors fort probable que ces pays soient sujets à une augmentation plus importante des cas de NAFLD. Parallèlement à la NAFLD, l'incidence de la

NASH serait elle aussi augmentée en 2030 et notamment en Europe. Les complications afférentes et notamment les stades avancés de fibrose (stades 3 et 4) seraient également en nette augmentation et on estime à 21% le nombre de patients NASH présentant une fibrose F3 ou F4 aux USA en 2030 ⁸.

A. Mortalité liée à la NAFLD/NASH

La NAFLD est considérée comme l'une des composantes du syndrome métabolique et la présence concomitante d'autres aspects de cette pathologie multiple impacte la mortalité des patients. L'étude NHANES a suivi des patients NAFLD sur 19 ans et a montré que la présence d'un seul composant du syndrome métabolique suffisait à doubler le risque de mortalité chez ces patients. Plus le patient présentera de marqueurs du syndrome métabolique (obésité, insulino-résistance...), plus l'espérance de vie sera impactée négativement. Les patients atteints de NAFLD bénigne avec une stéatose primaire présentent moins de risque de décompensation hépatique que ceux au stade NASH pour lesquels le risque de développer une maladie hépatique chronique est drastiquement accentué ³. On considère que la mortalité globale pour 1000 personnes-année est de 15,44 pour les patients NAFLD contre 25,56 pour les patients NASH ⁸. La présence d'une NASH, le stade de la fibrose et les composantes du syndrome métabolique comme l'obésité et le DT2 affectent grandement la survie.

Les conséquences cardiovasculaires et le risque de développer une maladie hépatique chronique alertent sur la mortalité liée à la NAFLD/NASH ¹¹. Les patients NAFLD/NASH présentent ainsi une diminution de leur survie avec un ratio de mortalité standardisé de 1.34 à 1.69 ¹⁶. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès chez ces patients : 5 à 10% des patients NAFLD décéderont des conséquences cardiovasculaires induites par leur pathologie et la NAFLD double le risque de développer une complication cardiovasculaire ⁸.

La deuxième cause de mortalité chez les patients NAFLD/NASH est le développement de cancers non-hépatiques. Enfin, en 3^{ème} position, on retrouve les complications mortelles liées au développement d'une pathologie hépatique chronique ²⁶.

Aux USA, la NAFLD est la 3^{ème} cause de cirrhose et tend à prendre la première place ²⁷. La présence d'une NASH triple la mortalité liée à une affection hépatique comparé à la population générale ¹⁵. On estime que la mortalité liée spécifiquement à des conséquences hépatiques est de 0,77/1000 personnes-année pour les patients NAFLD contre 11,77/1000

personnes-année pour ceux au stade NASH ²⁸. Le stade de fibrose apparaît comme facteur principal de mortalité chez les patients NAFLD : les patients présentant une fibrose de stade F3-F4 voient leur mortalité tripler comparé à la population générale.

La NAFLD et la NASH sont intimement liées au risque de développer un carcinome hépatocellulaire, 3^{ème} cause de décès par cancer dans le monde. Ainsi en Australie et Nouvelle-Zélande, le taux de patients NASH parmi les patients CHC est passé de 4 à 14% entre 2013 et 2017 soit une augmentation de 350% ²⁹. Si la NASH démultiplie le risque de CHC (risque multiplié par 7 pour les patients NASH avec un stade de fibrose F3 à F4), 50% des patients NAFLD présentant un CHC n'étaient pas en stade cirrhose ^{15 8}. Si une bascule épidémiologique est attendue avec une meilleure prise en charge de l'hépatite B et l'hépatite C, ces derniers restent actuellement les facteurs importants de développement du CHC dans le monde. Cependant, avec l'amélioration de leur prise en charge et la quasi-disparition du virus de l'hépatite C (VHC), la NAFLD pourrait rapidement devenir le contributeur majeur du CHC dans les pays occidentaux.

B. Transplantations hépatiques liées à la NAFLD

Les dernières études alertent sur l'augmentation des transplantations hépatiques liées à la NAFLD. Les principales causes de transplantations hépatiques mondiales sont liées au VHC, au virus de l'hépatite B (VHB), à l'alcool et au CHC. Avec une meilleure prévention du VHC et du VHB, on assiste à une régression des greffes en rapport avec ces maladies avec notamment une baisse de 9,6% des transplantations liées au VHC entre 2013 et 2017 ²⁴. Les greffes en lien avec les hépatites alcooliques sont quant à elles stables. A l'inverse, la NAFLD est actuellement la 3^{ème} cause de transplantation hépatique en Océanie avec une augmentation de 12,4% entre 1994 et 2017. Ces données corréleront parfaitement avec les observations aux USA où il a été montré que l'indication de transplantation hépatique suite à une NASH avait connu une progression fulgurante en 4 ans sur les listes de patients en attente d'un greffon ²⁸. Comme le taux de NAFLD suit l'accroissement de l'épidémie mondiale d'obésité, il semblerait que la NAFLD deviennent la première indication de transplantation hépatique dans les prochaines années.

Chapitre 2 : PATHOGENESE DE LA NAFLD/NASH

I. Hypothèses liées à la pathogenèse de la NAFLD/NASH

La NAFLD est une hépatopathie métabolique découlant de processus physiopathologiques complexes partiellement élucidés. Une première hypothèse proposée par Day et James en 1998, considérait la NAFLD comme étant une pathologie en deux étapes « the two-hit hypothesis », son avènement résultant de l'enchaînement successif d'altérations du métabolisme. Le premier hit correspondait à l'accumulation de triglycérides dans le foie. Le second hit, lui, se référait à une cascade de réactions inflammatoires et nécrotiques impliquant entre autres le stress oxydant, la peroxydation lipidique et une défaillance mitochondriale marquant la transition de la NAFLD vers la NASH ^{4, 30-32}.

Depuis 2010, cette théorie en deux temps est considérée comme obsolète et la communauté scientifique s'oriente vers une pathologie multi-hits où différentes voies pathogéniques interviendraient de manière simultanée, s'entretenant les unes les autres et influant sur la progression de la NAFLD en NASH. Ce processus multifactoriel complexe met en jeu une altération des métabolismes lipidiques et glucidiques, une insulino-résistance, un phénomène inflammatoire et une réaction immunitaire qui agissent en parallèle et s'entrecroisent rendant difficile l'établissement d'une hiérarchie causale. La pathogenèse de la NAFLD est sophistiquée et l'intrication d'un certain nombre de facteurs déclencheurs entraîne la mise en place d'un cercle vicieux aboutissant à la fibrose hépatique ³³.

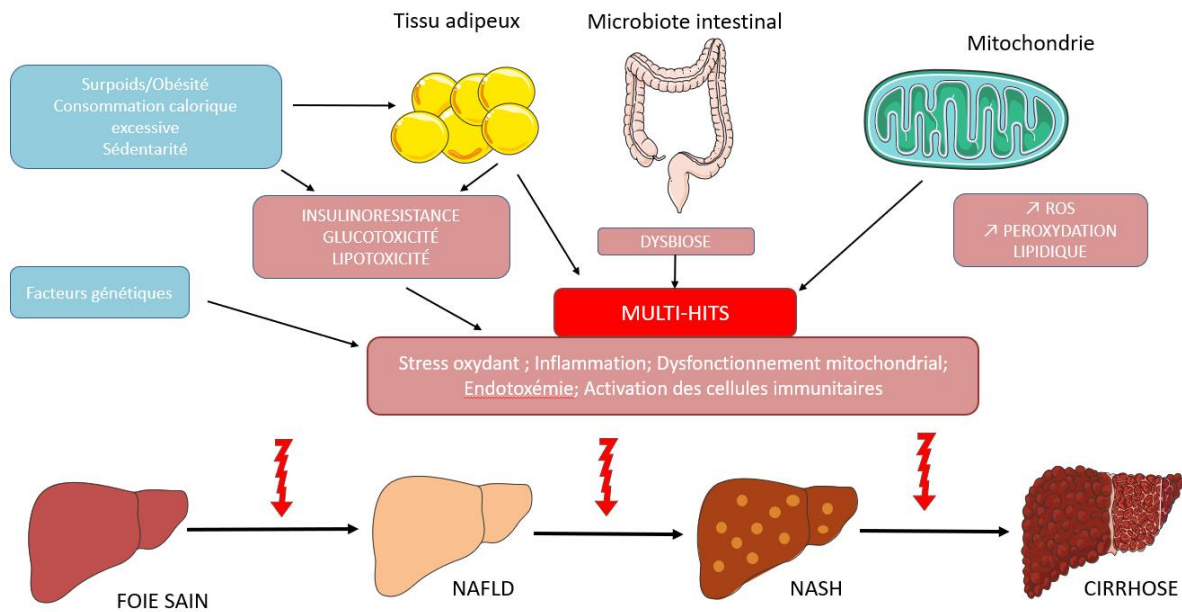


Figure 4: Pathogenèse « multi-hits » de la NAFLD; d'après Xu et al., 2019³¹

La NAFLD est une pathologie complexe découlant de l'action d'une multitude de facteurs dont les actions croisées induisent et perpétuent le développement et la progression de la maladie. On parle de « multi-hits ». Une consommation calorique excessive impacte le métabolisme du glucose et des lipides induisant une hyperinsulinémie, une glucotoxicité et une lipotoxicité. En parallèle, il y a mise en place d'un environnement inflammatoire chronique entraînant une réponse immunitaire et dysfonction des organites comme la mitochondrie. L'altération du MI prend part à la pathogenèse et est un co-facteur d'importance dans l'évolution de la NAFLD. Ces altérations favorisent le développement d'une fibrose et d'un état cirrhotique qui à termes peut évoluer en carcinome hépatocellulaire.

II. Mécanismes impliqués dans la NAFLD/NASH

A. Métabolisme des glucides et insulino-résistance

1. Métabolisme du glucose en conditions physiologiques

Le foie est la machinerie énergétique centrale de l'organisme et exerce de nombreuses fonctions métaboliques. Il joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie lipidique et glucidique et régule finement l'apport ou le stockage énergétique en fonction des besoins. L'activité métabolique du foie est sous l'influence de nombreux facteurs et substrats tels que les hormones, les nutriments ou les signaux neuronaux. Un des acteurs fondamentaux de l'équilibre homéostatique lipidique et glucidique est l'insuline.

L'insuline est un peptide de 6kDa sécrété par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle présente des récepteurs ubiquitaires et son rôle principal est de réguler le taux de glucose sanguin dont la concentration influe directement le métabolisme des lipides et des hydrates de carbone.

L'insuline se fixe à ses récepteurs IRTK situés sur l'ensemble des organes présentant une sensibilité à cette hormone (foie, tissu adipeux, muscle, cœur...) et va exercer une action pléiotropique afin de réguler l'homéostasie lipidique et glucidique de l'organisme en conditions physiologiques que ce soit à jeun ou après repas :

- synthèse protéique,
- transport du glucose,
- inhibition de la lipolyse,
- synthèse de glycogène,
- transcription génique,
- action anti-apoptotique.

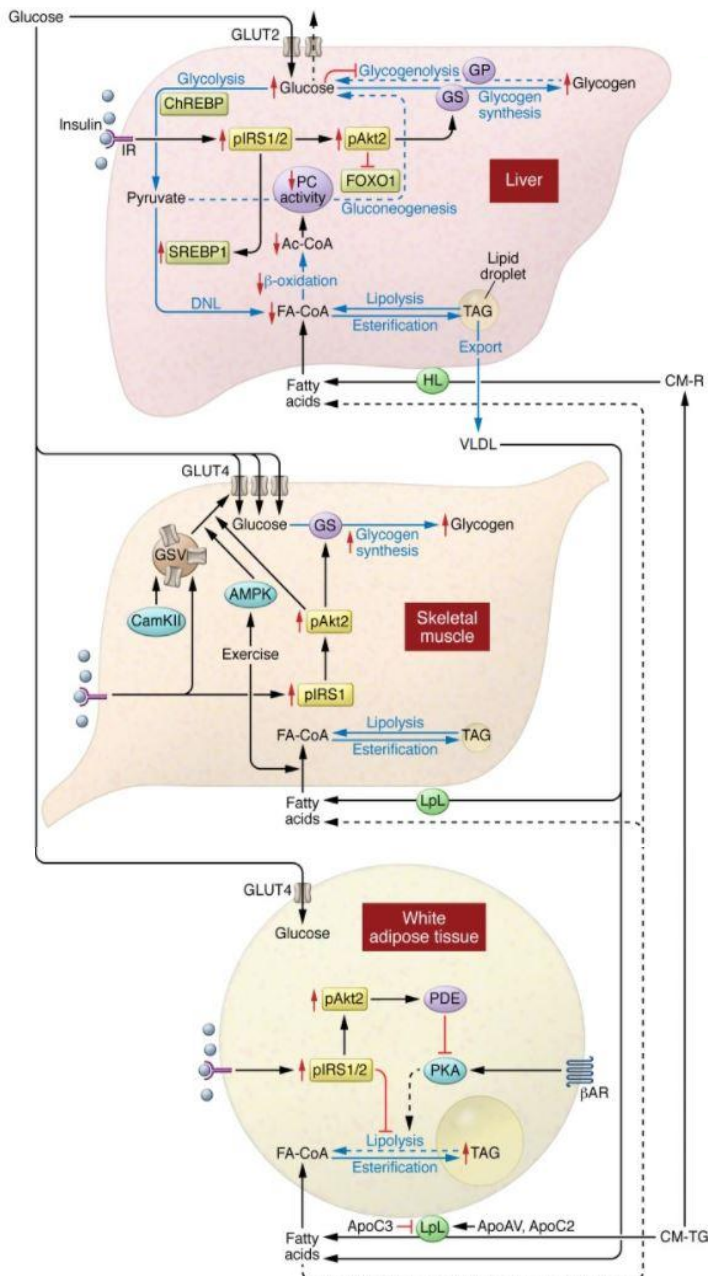


Figure 5: Signalisation insulinaire en conditions physiologiques; d'après Samuel et al., 2016³⁷

Dans le foie, le flux de nutriments (flèche bleue) est optimisé par une action coordonnée de signaux hormonaux et nutritifs. La signalisation insulinaire active la glycogène synthase (GS) via Akt2 et diminue en parallèle la transcription des enzymes gluconeogéniques en inactivant FOXO1. Le signal insulinaire promeut l'activation et l'expression de SREBP1. Le glucose inhibe la glycogénolyse et peut activer ChREBP. SREBP1 et ChREBP favorise la DNL. L'absorption hépatique des acides gras (AGs) provenant des chylomicrons remnants ou issus de la lipolyse périphériques contribuent également à la synthèse hépatique de lipides après réestérification.

Dans le muscle squelettique, l'insuline induit le déplacement des récepteurs au glucose GLUT4 à la surface cellulaire favorisant ainsi l'absorption de glucose et la synthèse de glycogène. Le muscle prend également en charge une partie des AGs pour oxidation.

Dans le tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipolyse et favorise l'absorption de glucose. Le tissu adipeux est le premier site de stockage pour les lipides avec une absorption coordonnées des chylomicrons remnants et des VLDL.

IR: récepteur à l'insuline; HL: lipase hépatique; CM-R: chylomicron remnants; CAM-KII: calmoduline kinase II; GS: glycogène synthase; GP: glycogène phosphatase; Ac-Coa: Acetyl-CoA

2. Insulinorésistance dans la NAFLD

L'insulinorésistance est un élément clé de la pathogenèse de la NAFLD.^{4, 33,34} Elle correspond à une altération de la capacité de réponse insulinique aux concentrations plasmatiques élevées en glucose et conduit entre autres à un défaut de stockage du glucose sous forme de glycogène³⁵. Plusieurs facteurs environnementaux et génétiques interviennent dans l'avènement de l'insulinorésistance dans la NAFLD.

On distingue deux types d'insulino-résistance: une insulinorésistance périphérique impliquant le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc, et une insulinorésistance hépatique spécifique et sélective.

a. Insulinorésistance périphérique

➤ Insulinorésistance musculosquelettique

Les organes périphériques ont tous une sensibilité différente à l'insuline. Il apparaît que le muscle squelettique est extrêmement sensible au signal insulinique³⁶. Ainsi l'insulinorésistance musculosquelettique apparaît dès les stades précoces du syndrome métabolique, bien avant qu'un impact soit ressenti sur la fonctionnalité du tissu adipeux ou du foie. Dans la NAFLD, l'homéostasie lipidique est altérée et suite au défaut de prise en charge et de stockage des acides gras, on observe une infiltration ectopique de lipides dans les tissus et notamment dans les myocytes. L'accumulation d'acides gras dans le muscle impacte le signal insulinique via différentes voies : stress du réticulum endoplasmique (RE), détérioration de l'activité mitochondriale, altération de la phosphorylation du récepteur à l'insuline. Le muscle n'est plus en capacité de stocker le glucose sous forme de glycogène en raison d'une altération de la translocation des récepteurs GLUT4 à la surface membranaire, leur stimulation qui dépend de l'insuline étant affectée³⁷. Il y a perte de l'absorption musculaire du glucose³³. Le glucose est alors redirigé vers le foie où il est absorbé pour réguler l'augmentation de la glycémie. Cette redirection glucidique promeut la lipogenèse *de novo* et l'hypertriglycéridémie.

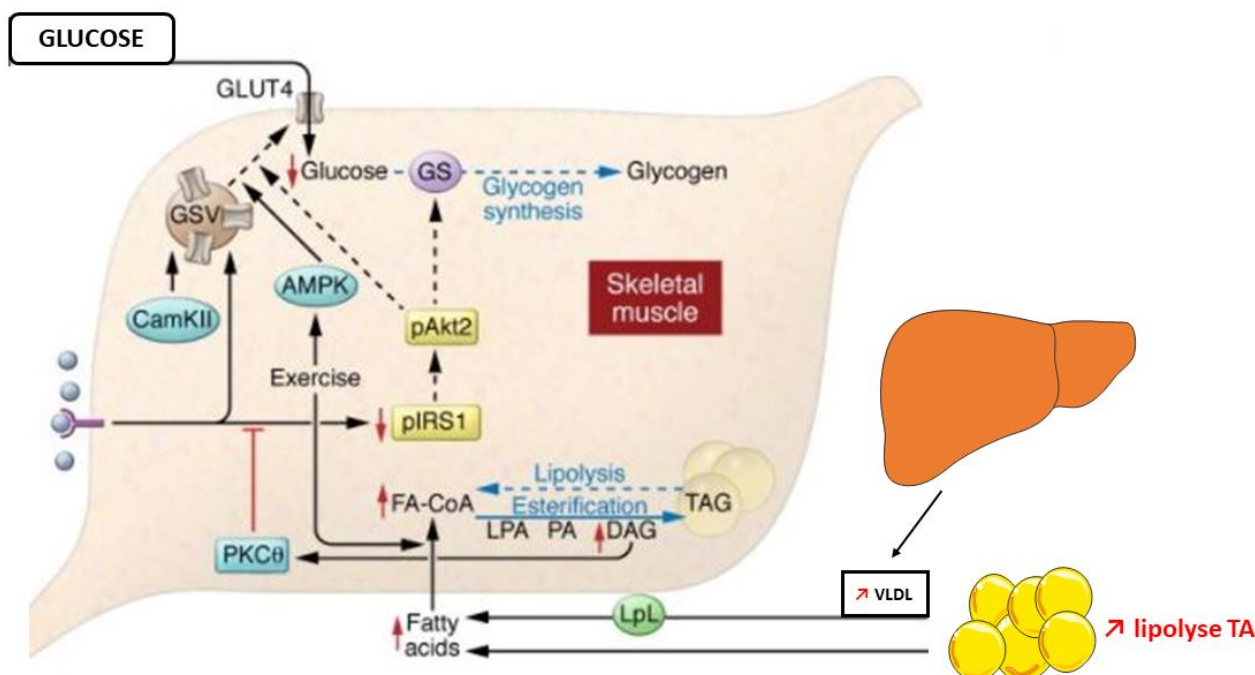


Figure 6: Insulinorésistance musculaire; d'après Samuel et al., 2016³⁷

Dans le muscle squelettique, l'activation de la PKCθ altère la signalisation insulinique impactant l'absorption de glucose par le muscle et entraînant une augmentation de l'apport en glucose au foie.

➤ Insulinorésistance du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est l'organe de stockage privilégié des réserves énergétiques. Il est doté d'une grande plasticité et réagit notamment aux signaux environnementaux. On distingue deux dépôts majeurs de TA : le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané. Si leur rôle principal est similaire (stockage de l'énergie), ces tissus présentent une activité endocrine différente, leur conférant des propriétés spécifiques³⁸.

Les acides gras et le glucose issus de l'alimentation sont stockés dans les adipocytes sous forme de triglycérides. En plus de sa fonction métabolique, le TA possède une fonction endocrine importante et sécrète des adipokines, telles que la leptine ou l'adiponectine impliquées dans l'homéostasie lipidique et glucidique³⁰. Le TA joue également un rôle prépondérant dans les phénomènes inflammatoires par la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, cytokines et chimiokines, comme l'IL-6 ou le TNFα. Enfin, le TA est constitué de macrophages qui, lorsqu'ils sont stimulés, contribuent aux phénomènes inflammatoires systémiques³⁹.

Lors de la NAFLD, la balance énergétique est positive avec une augmentation de l'afflux d'acides gras et de glucose. Le TA s'accroît alors pour faire face à cette augmentation énergétique et on assiste à un remodelage des adipocytes avec combinaison d'une hypertrophie et d'une hyperplasie^{40 41}. L'augmentation du volume adipocytaire conduit à une altération des fonctions cellulaires avec notamment un impact sur la fonction mitochondriale et une modification de l'expression des protéines membranaires. Ces changements influent sur la sécrétion hormonale des adipocytes et entraînent la mise en place d'une inflammation chronique de bas grade engendrant à terme l'augmentation de la mort cellulaire⁴¹. L'ensemble de ces processus aboutit à des modifications métaboliques globales et favorise l'insulinorésistance *in situ* mais aussi périphérique au sein du muscle squelettique et du foie.

Les adipocytes hypertrophiés ne sont plus en mesure de répondre correctement à la signalisation insulinique. Ils perdent leur capacité de stockage et de conversion des acides gras en triglycérides. En temps normal, l'insuline contrôle la lipolyse du TA. Lorsque les adipocytes deviennent insulinorésistants, on assiste à une perte de contrôle de la lipolyse par l'insuline et donc à la libération de quantités importantes d'acides gras et de glycérol dans la circulation sanguine³⁶. Le flot d'acides gras non-estérifiés et de glycérol est pris en charge par le foie. Dans le foie, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, tandis que le glycérol sert de substrat pour la gluconéogenèse³⁶.

Les modifications morphologiques des adipocytes induites lors de la NAFLD favorisent le relargage de cytokines pro-inflammatoires et notamment d'IL-6, de TNF α et d'IL-1 β ³⁹. Une inflammation chronique de bas grade se développe et impacte la sensibilité hépatique à l'insuline. En effet, la stimulation des macrophages hépatiques par les cytokines pro-inflammatoires libérées par le TA induit une altération de la phosphorylation d'IRS1, impactant la transmission du signal insulinique hépatocytaire. Parallèlement les cytokines pro-inflammatoires activent une voie pro-inflammatoire dans le foie qui à son tour inhibe la signalisation insuline dépendante³⁰.

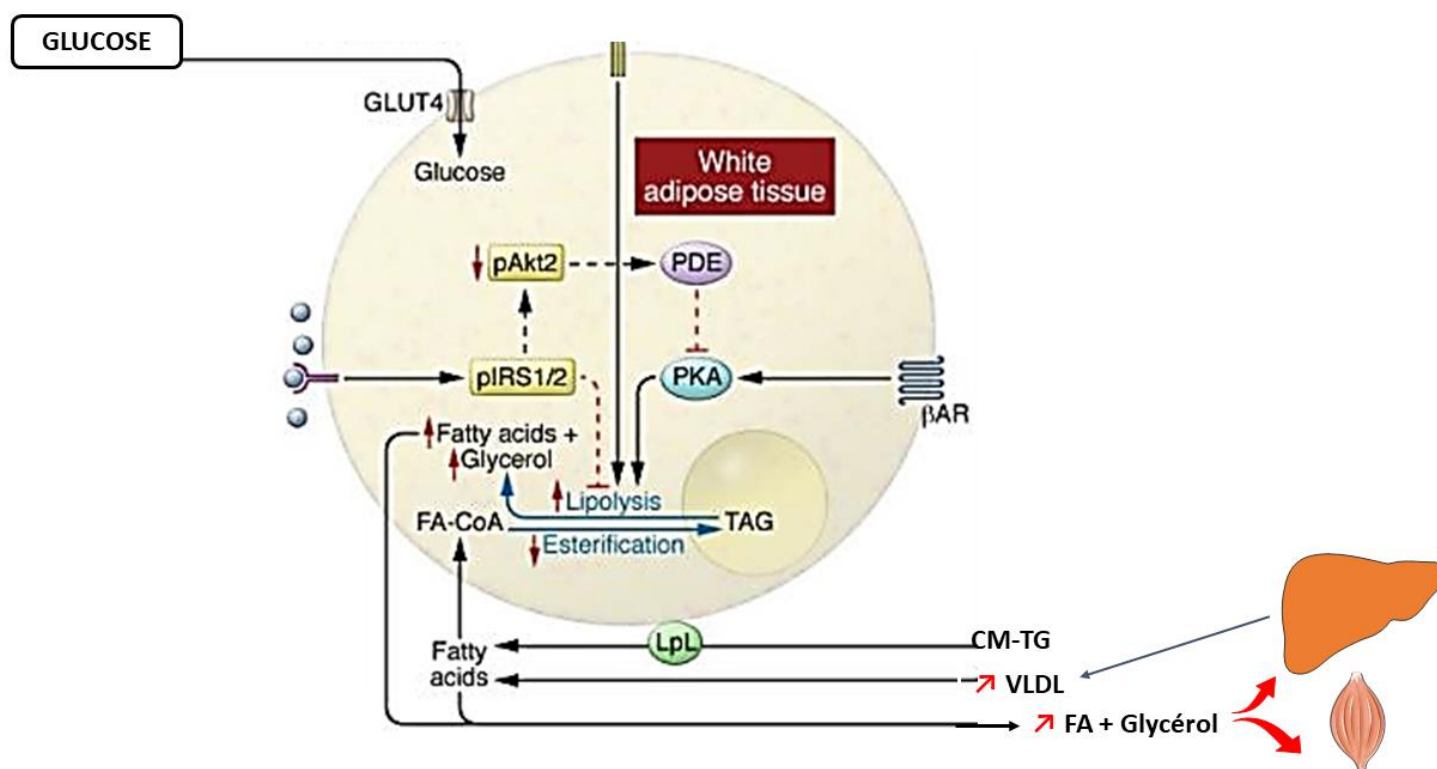


Figure 7: Insulino-résistance dans le tissu adipeux; d'après Samuel et al., 2016³⁷

Dans le tissu adipeux, les cytokines libérées stimulent la lipolyse adipocytaire et induisent une augmentation de la libération d'AGs. Cela stimule la synthèse hépatique de lipides et active la gluconeogenèse dans le foie.

FA : Acides gras ; CM-TG : triglycérides couplés aux chylomicrons ; FA-CoA : fatty-acyl CoA ; PKA : protéine kinase A ; PDE : phosphodiesterase

b. Insulino-résistance hépatique

L'insulino-résistance hépatique se caractérise d'une part par l'arrêt du blocage de la néoglucogenèse dans le foie normalement contrôlée par l'insuline, et d'autre part par un maintien concomitant de la lipogenèse³³. En conditions physiologiques, l'insuline régule la production de glucose en inhibant la glycogénolyse hépatique et la gluconéogenèse et favorise la synthèse de triglycérides ainsi que l'absorption du glucose. Lorsque les hépatocytes perdent leur sensibilité au signal insulinique, il y a augmentation de la production endogène de glucose via la glycogénolyse et la néoglucogenèse³³. Parallèlement, la perte de rétrocontrôle de l'insuline sur la lipolyse du TA entraîne une augmentation du flux d'acides gras non estérifiés qui atteint le foie via la circulation portale. Ces acides gras sont internalisés par le foie via des transporteurs FATP, via CD36 ou par diffusion passive et sont estérifiés dans l'hépatocyte pour être stockés sous forme de triglycérides. Dans le même temps, la lipogenèse *de novo* (DNL)

est conservée via activation de SREBP1c (Sterol regulatory element-binding proteins) aboutissant également à la synthèse de triglycérides à partir du glucose ¹⁷. C'est ce qui définit le paradoxe de l'insulinorésistance hépatique : la production de glucose normalement bloquée par l'insuline ne l'est plus, et *a contrario* la lipogenèse insulino-dépendante continue, elle, de fonctionner via activation de SREBP1c. Ce phénomène s'explique en particulier par la stimulation de la glycogénolyse intracellulaire sous contrôle d'un autre gène, ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) dont l'activité mène à la libération de précurseurs métaboliques pour la DNL. On assiste donc à une augmentation concomitante de la glycémie et de la lipidémie ce qui concourt au développement de la NAFLD.

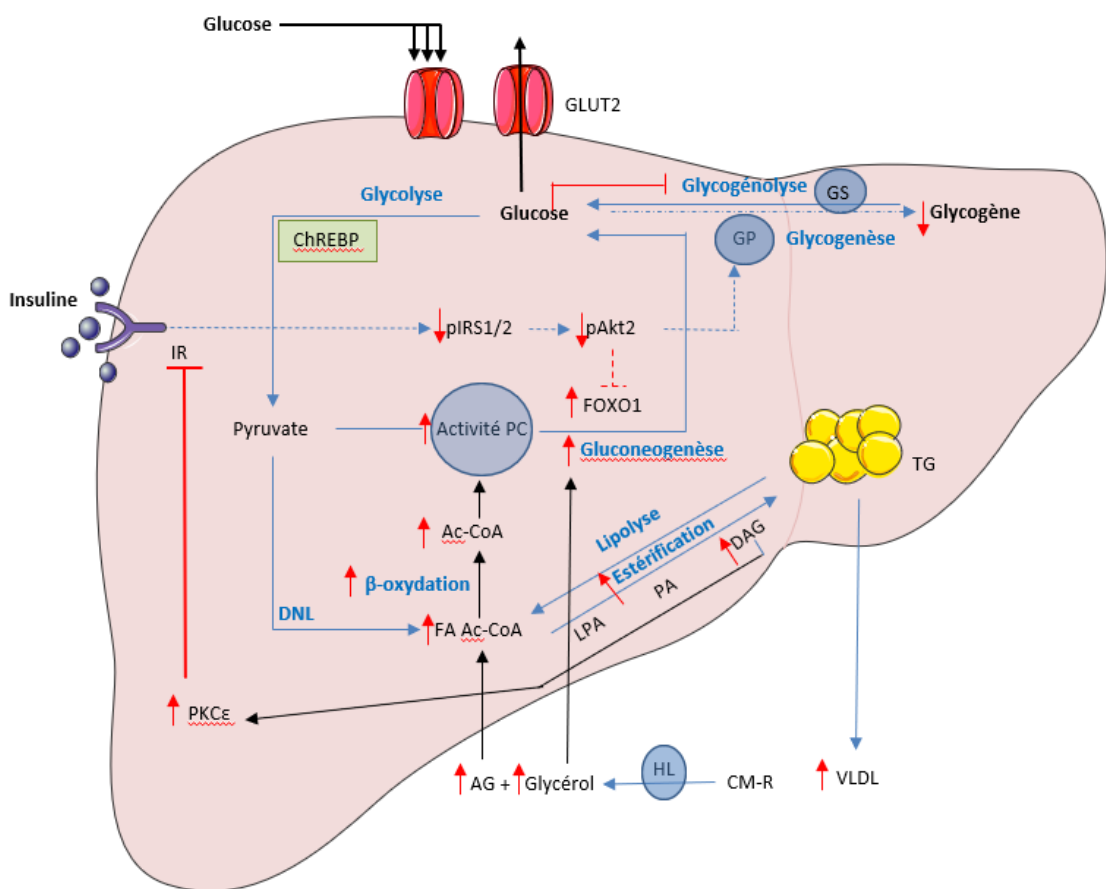


Figure 8: Insulinorésistance hépatique; d'après Samuel et al., 2016 ³⁷

Dans le foie, l'activation de la PKCε par le DAG altère la signalisation insulinique ce qui limite la synthèse hépatique de glycogène. En revanche la synthèse hépatique de lipides via notamment la DNL n'est pas impactée. Par ailleurs, le foie fait face à une augmentation des AGs, de glycérol et de glucose suite aux dysfonctionnement du tissu adipeux et du muscle squelettique. Il y a donc augmentation de la gluconeogenèse et de la lipogenèse qui participent à la stéatose.

IR: insulín receptor; IRS: insulín receptor substrate; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase, glucose 6-phosphase., FA: fatty acid, PC : pyruvate carboxylase; DAG: diacylglycerol ; GS : glycogène synthase ; GP : Glycogène phosphorylase ; LPA : acide lysophosphatidique ; PA : acide phosphatidique ; HL : lipase hépatique

Les mécanismes amorçant et nourrissant l'insulinorésistance hépatique sont similaires à ceux observés dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique.

Un des mécanismes liés à la perte du signal insulinique réside dans l'altération fonctionnelle du récepteur à l'insuline et de sa protéine substrat IRS-1. En condition d'insulinorésistance, IRS-1 est phosphorylée sur ses résidus sérine empêchant l'insuline d'induire la phosphorylation de ses sites tyrosine altérant par voie de conséquence son interaction avec PI3K ce qui impacte l'ensemble des cascades de signalisation en découlant. De nombreux signaux cellulaires et notamment des médiateurs de l'inflammation peuvent induire ces phosphorylations dites « négatives » d'IRS-1 perpétuant les dommages liés à la perte de sensibilité insulinique. Parmi les médiateurs incriminés on retrouve le TNF α et l'IL-1 β sécrétés par le TA en réaction à un surplus énergétique.

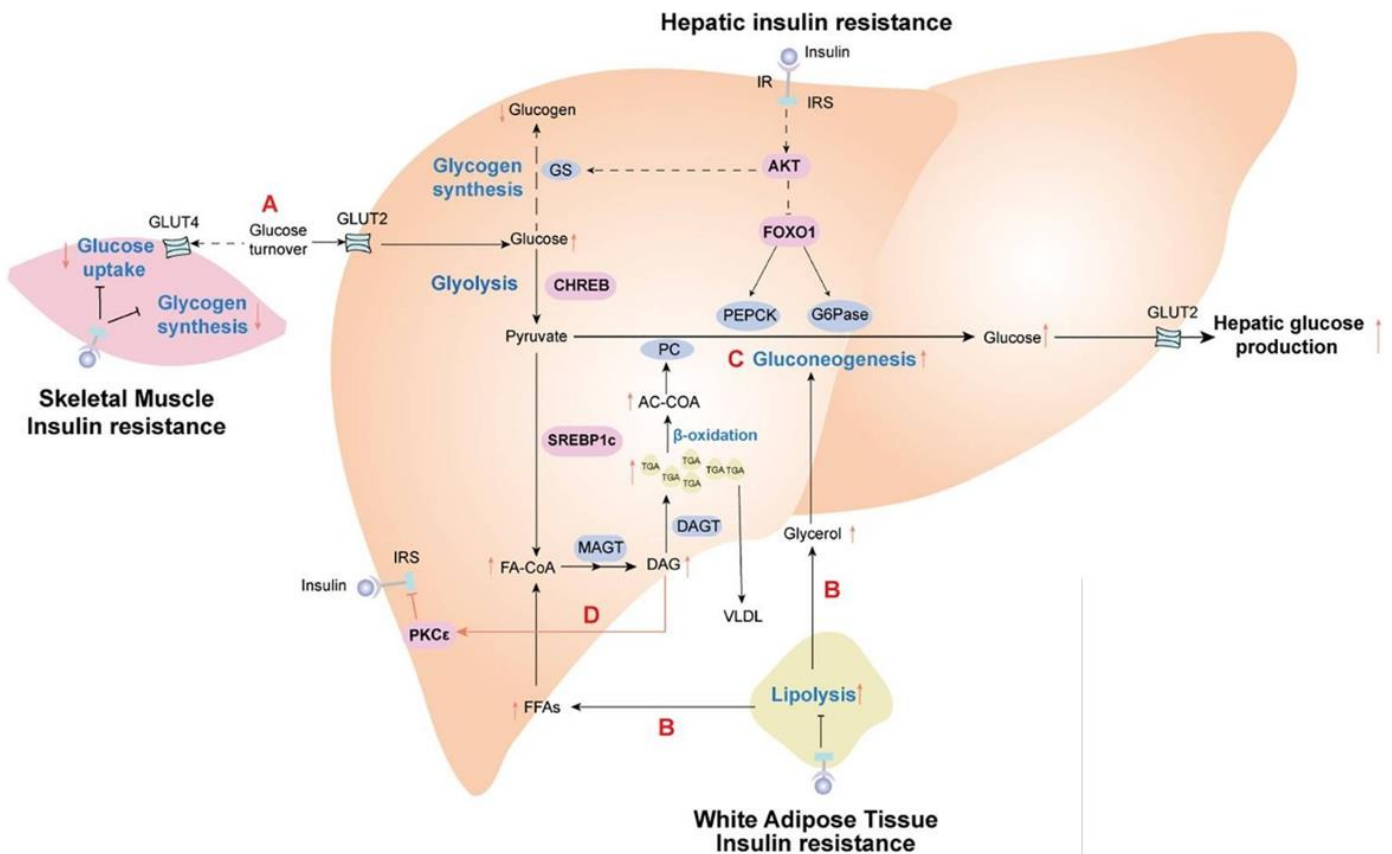


Figure 9: Schéma général de l'insulinorésistance et des interactions entre le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique; d'après Mu et al., 2019³⁶

- (A) L'insulinorésistance du muscle squelettique altère l'absorption du glucose insulino-dépendante et induit une augmentation de la livraison de glucose au foie
- (B) L'insulinorésistance adipocytaire altère l'inhibition de la lipolyse dépendante de l'insuline ce qui entraîne une libération d'AGs et de glycérol dans la circulation systémique. Ces nutriments sont redirigés vers le foie où ils induisent la synthèse hépatique de lipides et la néoglucogenèse hépatique.
- (C) Dans le foie, l'augmentation de l'oxydation des AGs active la gluconeogenèse hépatique via l'activation de la PC (pyruvate carboxylase) par l'acétyl-CoA; le glycérol augmente lui-même la gluconeogenèse via un push de substrats
- (D) Le DAG active la PKC ϵ ce qui impacte la signalisation insulinique et empêche la synthèse de glycogène

REVUE DE LITTÉRATURE : Pathogenèse de la NAFLD/NASH

Il y a donc altération du stockage du glucose par diminution de la synthèse de glycogène et en parallèle augmentation de la synthèse de glucose et de lipides: c'est l'insulinorésistance hépatique sélective. IR: insulin receptor; IRS: insulin receptor substrate; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6Pase, glucose 6-phosphatase., FA: fatty acid, PC : pyruvate carboxylase; DAG: diacylglycerol

Les flèches noires pleines correspondent aux voies métaboliques physiologiques

Les flèches noires en pointillés et les flèches rouges correspondent elles aux modifications induites en situation pathologique.

Un autre mécanisme causal proviendrait de l'accumulation intra-organique de lipides toxiques et notamment du diacylglycérol (DAG). L'infiltration de DAG induit l'activation d'isoformes de la PKC (Protéine Kinase C) et notamment de la PKC ϵ dans le foie et de la PKC θ dans le muscle squelettique. Dans le muscle squelettique, la PKC θ impacte la phosphorylation d'IRS-1 par IRTK altérant la signalisation insulinique et concourant à l'insulinorésistance musculaire³⁷. Dans le foie, l'interaction DAG-PKC ϵ induit une diminution d'activation d'IRTK par l'insuline³⁶, la PKC ϵ présentant un site de phosphorylation adjacent au domaine tyrosine kinase d'IRTK1 au niveau du site Thr1160⁴². Il est maintenant établi que le contenu en DAG et l'activation de la PKC ϵ sont nécessaires à l'établissement de l'insulinorésistance dans la NAFLD induite par les lipides et que ces deux paramètres sont des prédicteurs majeurs de l'insulinorésistance hépatique³⁷.

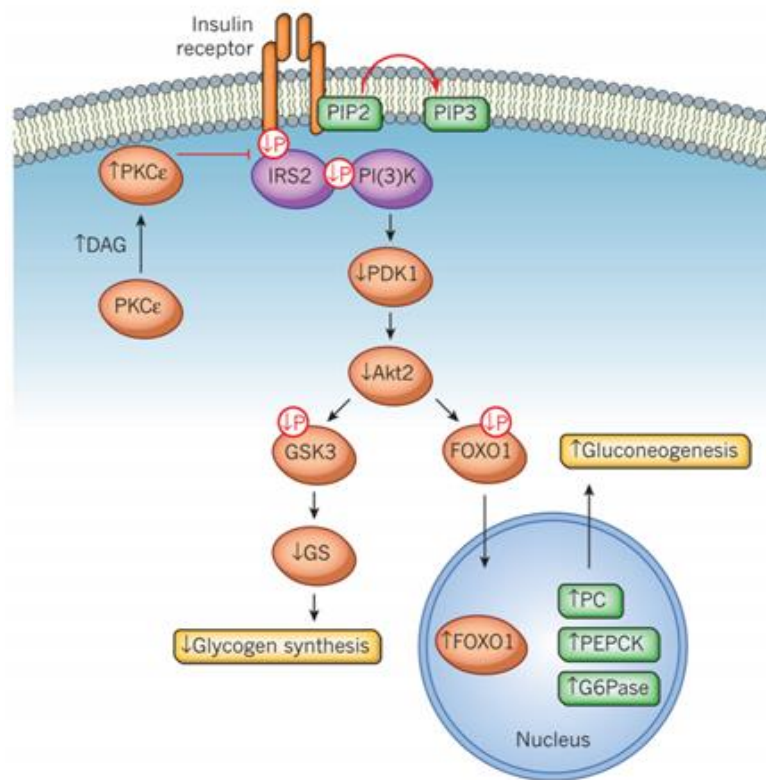


Figure 10: Mécanisme moléculaire par lequel un excès en diacylglycérol entraîne le développement de l'insulino-résistance hépatique et l'hyperglycémie; d'après Perry et al.,2014⁵³

L'augmentation hépatique de DAG entraîne l'activation et la translocation de la PKCε à la membrane cellulaire ce qui inhibe la signalisation insulinaire. Il y a diminution de la phosphorylation de IRS1/2 et PI3K ce qui affecte l'activité d' Akt2 après une cascade de signalisation. Cette perte d'activité diminue la phosphorylation de GSK3 d'une part induisant une diminution de la synthèse de glycogène. D'autre part la diminution de phosphorylation de FOXO1 entraîne sa translocation nucléaire où il va induire l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de glucose hépatique.

PC: pyruvate carboxylase ; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase ; G6Pase: glucose-6-phosphatase; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; FOXO1: Forkhead box protein O1 ; DAG: diacylglycerol; PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; GSK3: glycogen synthase kinase-3 ; GS: glycogen synthase

B. Métabolisme hépatique des lipides et lipotoxicité

1. Sources d'acides gras et absorption hépatique des lipides

Le foie est un des organes privilégiés du métabolisme des lipides. Il reçoit les acides gras sous forme non-estérifiée via différentes sources alimentaires ou endogènes.

Les lipides d'origine alimentaires sont, dans un premier temps, émulsifiés dans l'intestin sous l'action des acides biliaires puis hydrolysés par la lipase, enzyme pancréatique. Cela aboutit à la formation de molécules de glycérol et d'acides gras libres. Les entérocytes prennent en charge les acides gras et reforment des triglycérides. Les TG s'associent à des apolipoprotéines et sont transportés sous forme de chylomicrons par la lymphe pour être distribués au tissu

adipeux blanc et au muscle. Les chylomicrons restants dits « remnants » sont eux dirigés vers le foie où ils sont internalisés ⁴³.

Une source importante d'acides gras provient de la lipolyse du TA pendant les périodes de jeûne. La diminution des concentrations plasmatiques en insuline favorise la destruction du tissu adipeux pour répondre aux besoins énergétiques de l'organisme en mettant à disposition les substrats énergétiques qui lui sont nécessaires. Les acides gras ainsi relargués se lient à l'albumine et sont acheminés vers le foie où ils seront absorbés ^{43, 44}.

Dans le foie, les acides gras non-estérifiés sont soit convertis en triglycérides, en phospholipides ou en esters de cholestérol, soit hydrolysés par la β -oxydation mitochondriale et servent de substrat énergétique pour la synthèse d'ATP nécessaire à la respiration de la chaîne mitochondriale ⁴⁵.

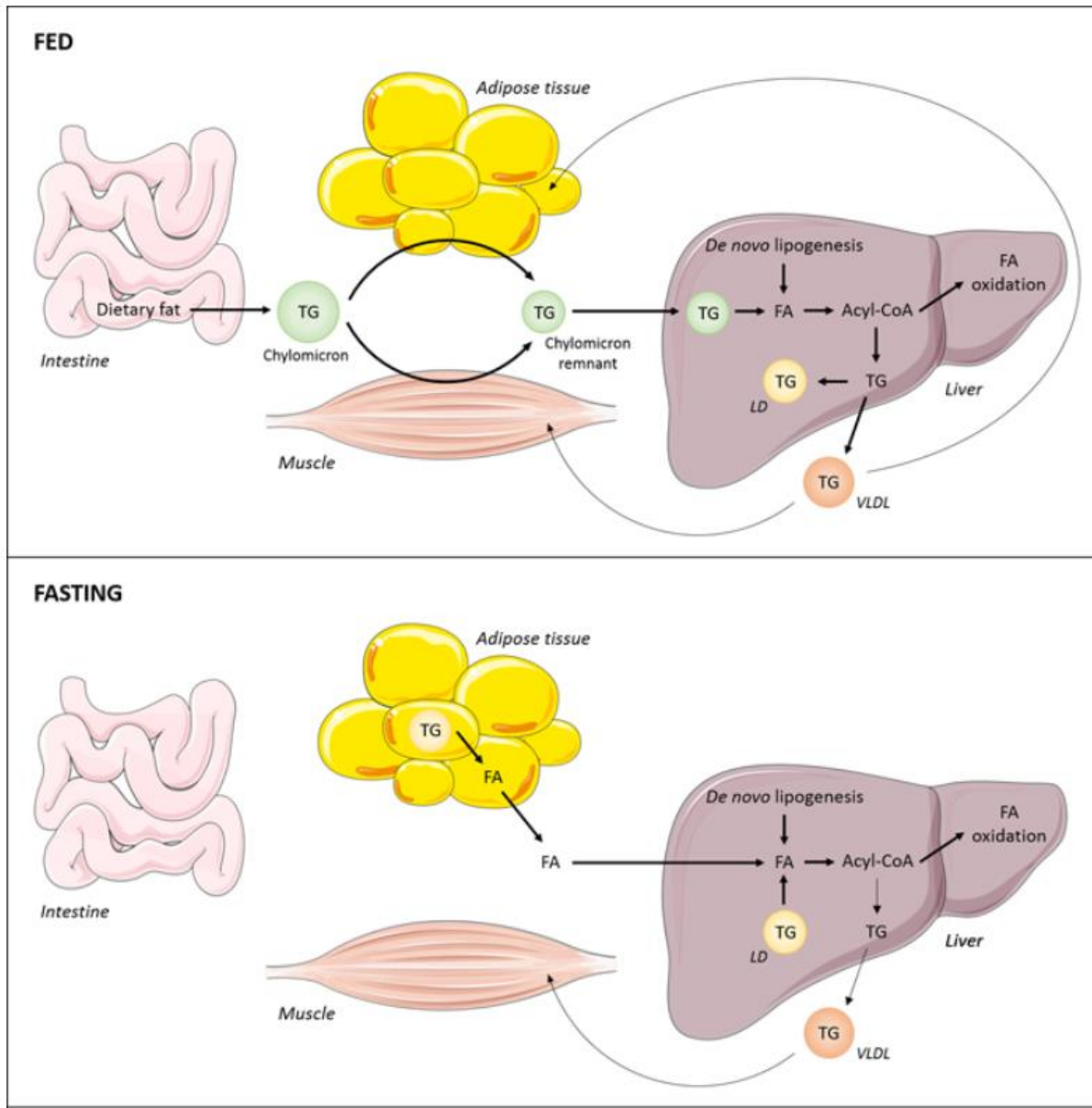


Figure 11: Sources majeures de lipides dans le foie en fonction de l'état nutritionnel; d'après Alves-Bezerra et al., 2019 ⁴³ Après un repas, les lipides alimentaires sont hydrolysés dans la lumière intestinale. Lors de l'absorption intestinale, les acides gras sont estérifiés pour former des molécules de TG. Les TG sont empaquetées dans les chylomicrons et livrées dans un premier temps au muscle et au tissu adipeux. Les TG restants au sein des chylomicrons remnants sont transportés au foie et traités intracellulairement induisant une libération d'AGs dans les hépatocytes. Les carbohydrates et en particulier le glucose sont utilisés pour la lipogenèse de novo (DNL) pour la production d'AGs. Afin d'être métabolisés, les AG sont activés sous forme de molécules d'acyl-CoA qui peuvent alors être oxydés ou participer à la synthèse de lipides complexes. Les TG synthétisées peuvent être stockées dans des gouttelettes lipidiques (LD) ou empaquetées en VLDL et être sécrétées dans le plasma. A jeun, les stocks intracellulaires de TG sont mobilisés dans les adipocytes et les hépatocytes pour libérer des AGs. Enfin la DNL hépatique peut participer à la formation d'un pool d'acyl-CoA disponible pour la production d'énergie via oxydation mitochondriale ou pour la synthèse de VLDL. FA: fatty acid; TG: triglycérides; LD: lipid droplet

L'épaisseur des flèches noires renseigne sur les activités métaboliques préférentielles en post-prandial et à jeun.

2. Lipogenèse *de novo*

Une des sources de lipides dans le foie correspond à la lipogenèse *de novo* qui permet la conversion des substrats glucidiques apportés par la circulation portale en triglycérides.

Dans le cytoplasme, la glycogénolyse induit la libération du glucose à partir du glycogène. La molécule de glucose subit plusieurs transformations enzymatiques lors de la glycolyse pour donner une molécule de pyruvate. Le pyruvate sert de substrat initiateur pour le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie. Dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé puis décarboxylé en acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA, sous l'action de la citrate synthase, est transformé en oxaloacétate. L'oxaloacétate ainsi formé est transporté dans le cytosol via la membrane mitochondriale interne. L'oxaloacétate est transformé en malonyl-CoA après action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), cette première étape réactionnelle étant limitante dans le processus de la DNL. La fatty acyl synthase (FAS) prend en charge le produit obtenu et le transforme en palmitate. S'en suit une chaîne réactionnelle aboutissant à la formation de glycérol-3-phosphate (G3P)³³. Le G3P permet alors l'obtention de triglycérides après estérification.

FAS et ACC sont induites en fonction du statut nutritionnel de l'organisme. Ainsi, un régime riche en carbohydrates et par voie de conséquence une hyperinsulinémie ou une hyperglycémie entraîneront leur expression.

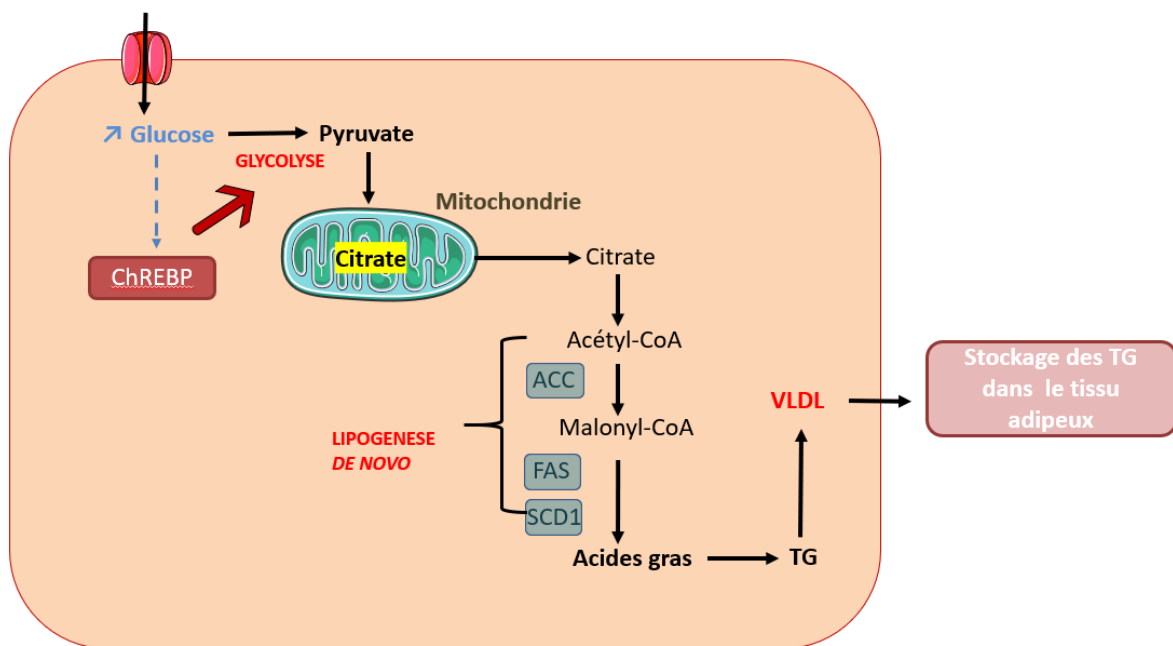


Figure 12: Schéma de la lipogenèse *de novo*

Le glucose entre dans le foie via le transporteur de glucose. Dans la cellule, le glucose peut servir de substrat à la lipogenèse *de novo* et permettre la formation finale de VLDL.

Deux acteurs majeurs régulent la lipogenèse *de novo* : SREBP1c et ChREBP.

➤ SREBP1c

SREBP1c est un facteur de transcription dont l'expression dépend de l'état nutritionnel de l'organisme. Il est stimulé et activé par l'insuline via la voie de signalisation PI3K/Akt et par le liver receptor X (LXR). SREBP1c promeut la transcription de gènes impliqués dans la DNL et dans l'utilisation du glucose⁴⁶.

Chez les patients NAFLD, on observe une surexpression de SREBP1c. Au contraire, si on supprime l'expression de SREBP1c on assiste à une augmentation compensatoire de son isoforme SREBP2 qui lui joue un rôle dans la synthèse et l'accumulation de cholestérol *in vivo*⁴⁷.

➤ ChREBP

L'activation de ChREBP est dépendante du glucose où une augmentation de sa concentration induit la formation de xylulose 5-phosphate (Xu5P), un intermédiaire de la voie des pentoses-phosphate. Le Xu5P active ensuite la protéine phosphatase A2 qui déphosphoryle ChREBP sur un site spécifique provoquant sa translocation nucléaire. Après une nouvelle déphosphorylation, ChREBP interagit avec des séquences spécifiques ChoRE sur ses gènes cibles permettant leur transcription. D'autres métabolites du glucose peuvent également participer à l'activation de ChREBP comme le glucose-6-phosphate (G6P) ou le fructose-2,6-biphosphate (F2,6P2).⁴⁸ Parmi les gènes cibles de ChREBP on retrouve la L-PK, ACC et FAS, acteurs majeurs de la glycolyse et de la DNL^{46, 49}

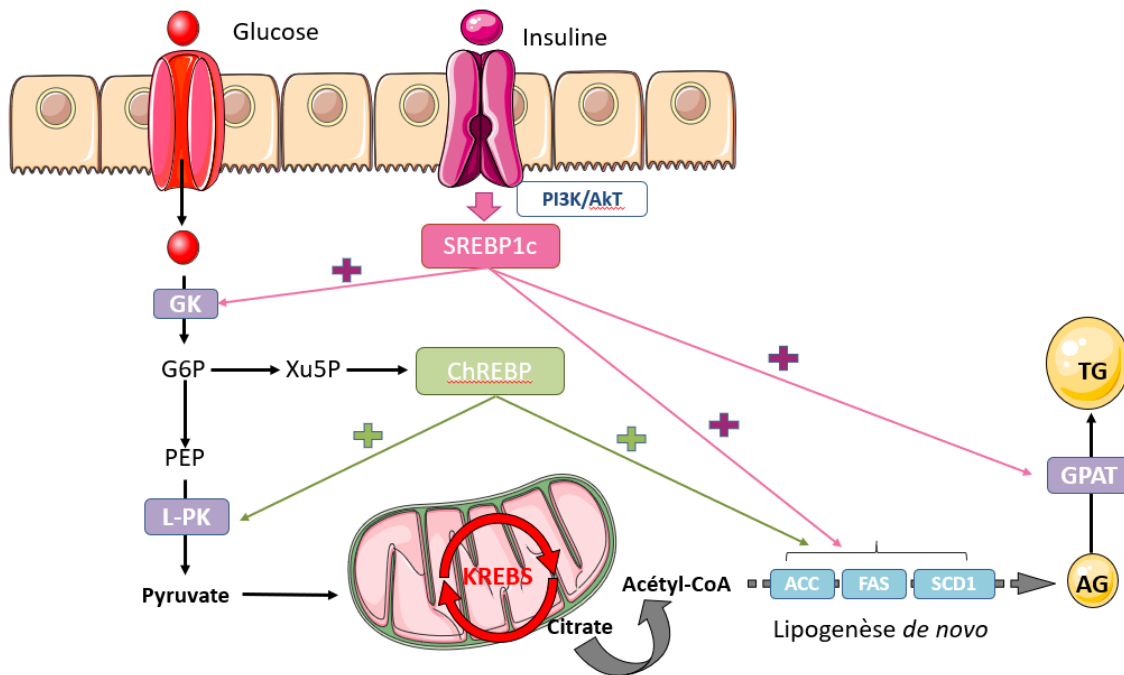


Figure 13: Contrôle transcriptionnel des voies de la glycolyse et de la lipogenèse.

L'insuline et le glucose activent des facteurs de transcriptions qui vont participer à la synthèse des lipides. L'insuline active SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1) par la voie de la PI3K/AKT et le glucose active quant à lui ChREBP (CarboHydrate Responsive Element Binding Proteins). ChREBP et SREBP1 vont agir sur les enzymes de la glycolyse permettant la formation de pyruvate. Le pyruvate est transformé en citrate par le cycle de Krebs puis en acétyl-CoA, substrat de la lipogenèse de novo. SREBP1c et ChREBP peuvent favoriser directement l'expression d'ACC, FAS et SCD1 aboutissant à la formation d'acides gras. Ces AGs sont ensuite pris en charge par la GPAT et transformés en TG.

3. Oxydation des acides gras

En période de jeûne, le TA libère de grandes quantités d'acides gras et de glycérol par le biais de la lipolyse. Deux voies sont alors possibles : une conversion en TG pour stockage ou l'oxydation mitochondriale pour produire de l'énergie. L'oxydation des acides gras est la source principale d'énergie pour le foie. Les acides gras captés par la circulation portale sont, dans un premier temps, convertis dans la membrane externe mitochondriale en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase. On parle d'activation des acides gras³⁵. La β -oxydation a lieu à dans la membrane interne mitochondriale. L'acyl-CoA synthétisé dans la membrane externe est transporté par une enzyme la carnitine palmitoyltransférase I (CPT1) qui le convertit en acyl carnitine⁴⁷. La carnitine translocase sert de navette et permet à ce nouveau composé d'être transporté dans la membrane interne mitochondriale³⁵. La β -oxydation des acides gras consiste en une succession de 4 réactions oxydatives entraînant des coupures enzymatiques de leur chaîne carbonée pour former des molécules bicarbonées d'acétyl-CoA. La chaîne réactionnelle se poursuit jusqu'à dégradation complète de l'acide gras en molécules d'acétyl-

CoA. C'est ce que l'on nomme « l'hélice de Lynen ». A chaque tour, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH, H⁺ sont libérées⁵⁰.

L'acétyl-CoA ainsi généré est orienté vers deux voies distinctes dépendantes de l'état nutritionnel de l'organisme. En post-prandial, il sert de substrat au cycle de Krebs et est transformé en H₂O et CO₂. En période de jeûne, l'acétyl-CoA est transformé par condensation en corps cétoniques, qui une fois exportés hors du foie servent de source d'énergie pour les organes périphériques où ils seront de nouveau convertis en acétyl-CoA puis dirigés vers le cycle de Krebs.

La régulation de la β -oxydation dépend en partie de la concentration en produits réactionnels et notamment des ratios NADH/NAD⁺ et acétyl-CoA/CoA, l'augmentation de ces rapports entraînant une diminution de la β -oxydation. La CPT1 permettant la translocation de l'acyl-CoA dans la membrane interne mitochondriale est sous le contrôle du malonyl-CoA.

Enfin des mécanismes de régulations transcriptionnels entrent en jeu avec notamment implication des récepteurs nucléaires PPARs (peroxysome proliferator-activated receptors) et de PGC-1 α (peroxysome proliferator-activated receptors gamma coactivator 1-alpha) ⁵¹.

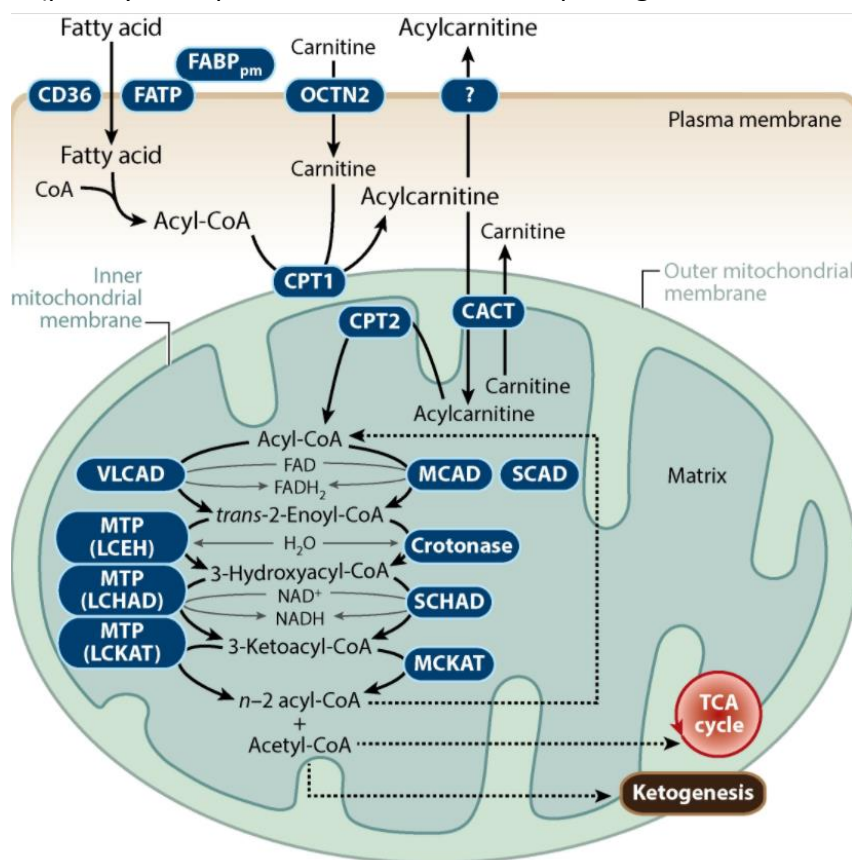


Figure 14: β -oxydation mitochondriale des acides gras; d'après Houten et al., 2016 ⁵⁰

La β -oxydation correspond à des coupures successives de la chaîne des acides gras en molécule à deux carbones : l'acétyl-CoA. Cette dégradation séquentielle nécessite quatre étapes enzymatiques qui se déroulent dans la matrice mitochondriale. La dégradation complète de l'acide gras se poursuit jusqu'à ce que la chaîne carbonée soit entièrement découpée en molécules d'acétyl-CoA : il s'agit de l'hélice de Lynen. A chaque tour, l'acyl-CoA est raccourci de deux atomes de carbone et libère une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH. Cette dégradation intervient par oxydations sur les carbones β successifs, d'où le terme de « β -oxydation ».

4. Formation des VLDL et exportation des triglycérides

Une partie des acides gras synthétisés dans le foie sert à la synthèse de TG permettant leur mise en réserve énergétique. Plusieurs étapes successives permettent la synthèse de monomères, dimères puis trimères de glycérol, fonction du nombre d'acyl-CoA ajoutés. La première étape aboutissant à la synthèse de polymères de glycérol correspond à la conversion du G3P en acide lysophosphatidique (LPA) par la GPAT (G3P-acyltransférase)⁴³. Le LPA est estérifié en acide phosphatidique (PA) qui subit une déphosphorylation le transformant en diacylglycérol (DAG). La diacylglycérol acyltransférase (DGAT) induit l'acylation du diacylglycérol conduisant à la formation de TG. Les lipides issus de la lipogenèse *de novo* sont majoritairement orientés vers la formation de VLDL-TG (very-low density protein) et pris en

charge par la DGAT1, tandis que les AG exogènes sont pris en charge par la DGAT2 pour le stockage sous forme de TG. Les gouttelettes lipidiques de TG peuvent ensuite être réorientées dans le RE et participer à la production des VLDL-TG via DGAT1⁴³

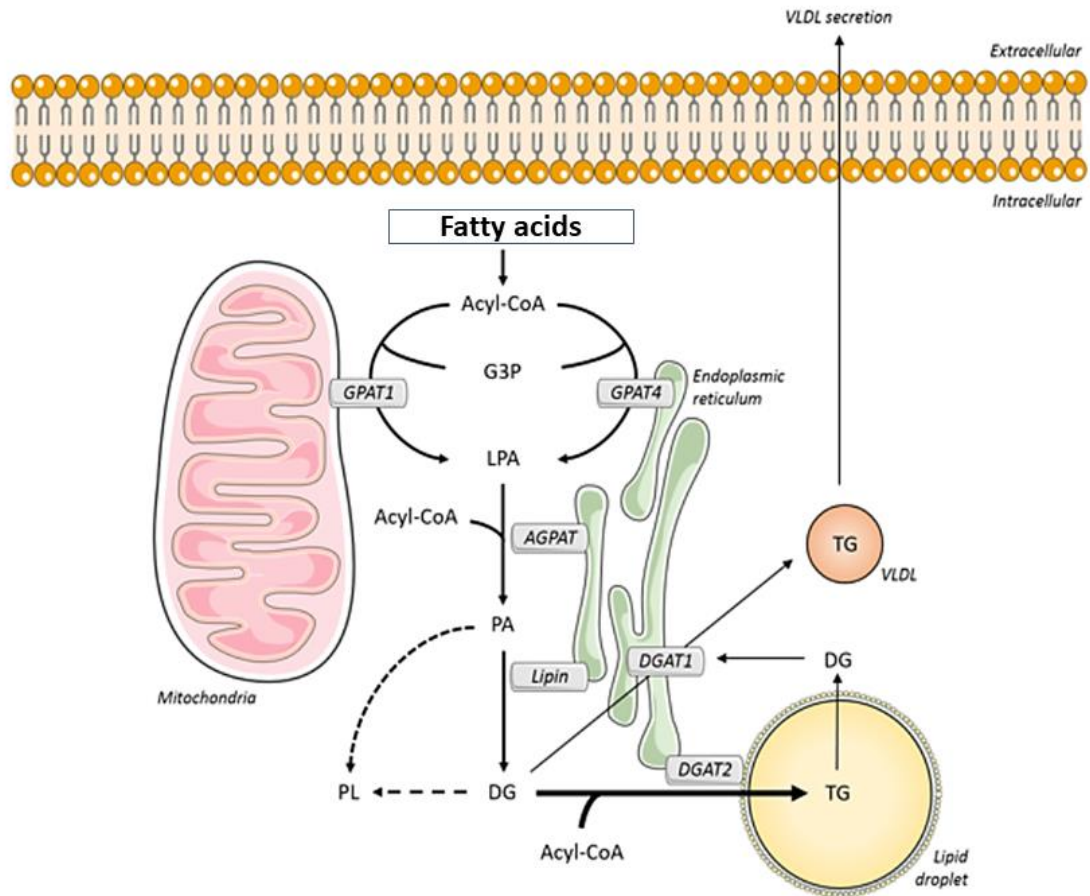


Figure 15: Formation des triglycérides hépatiques; d'après Alves-Bezerra et al., 2016⁴³

Les molécules d'acyl-CoA sont estérifiées en G3P par les isoformes de la G3P-acyltransférase (GPAT). L'acide lysophosphatidique formé va subir des transformations successives aboutissant à la formation de diacylglycérol (DG). Le DG peut participer à la synthèse de phosphatidylcholine (PL) ou être pris en charge par les DGAT pour être transformé en triglycérides (TG). Les TG sont soit stockés dans le foie, soit incorporés au VLDL pour leur export.

Les TG formés sont dirigés vers le RE pour former des particules lipidiques permettant leur transport dans la circulation sanguine vers leurs organes cibles.⁴³ La première étape de la formation des VLDL est sous le contrôle de la MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) qui permet d'incorporer une petite quantité de TG dans une molécule d'apoB100⁵². La molécule formée traverse différents compartiments cellulaires et se charge progressivement en lipides⁴⁷. Le taux en triglycérides est extrêmement variable au sein des particules de VLDL. Les VLDL sont également chargées en cholestérol et en autres apolipoprotéines. Leur sécrétion dans la circulation sanguine permet l'apport des lipides vers les organes périphériques et notamment vers le tissu adipeux⁵³.

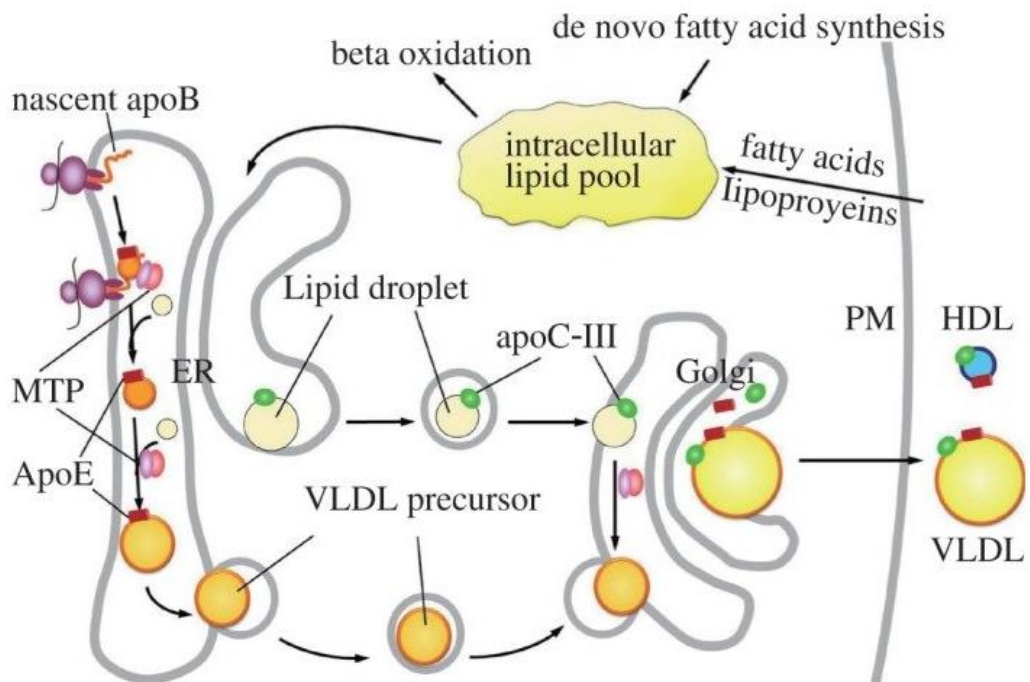


Figure 16: Synthèse des VLDL; d'après Jiang et al.,2013⁵²

La synthèse des VLDL se synchronise avec la maturation de l'apoB-100 le long du reticulum endoplasmique (RE) et du Golgi. Les particules naissantes d'apoB100 forment une particule au sein du RE avec l'aide de la MTP. Cette particule primitive s'accroît progressivement pendant la translation de l'apoB via l'ajout de lipides. Au sein du RE, des gouttes lipidiques se forment en parallèle et portent l'apoC-III. Le précurseur des VLDL se combine avec ces gouttelettes lipidiques intraluminales soit dans le RE soit dans le Golgi. Les VLDL matures ainsi formées sont sécrétées dans la circulation systémique par exocytose. PM: plasma membrane; VLDL: very low density lipoprotein; ER: endoplasmic reticulum; MTP: microsomal triglyceride-transfer protein.

Le foie est un organe clé du métabolisme des lipides et prend en charge les acides gras issus de la circulation sanguine, soit en provenance du tissu adipeux, soit apportés par l'alimentation. Il peut également synthétiser des AGs *de novo* à partir de substrats glucidiques. Les AGs vont être stockés sous forme de TG dans les hépatocytes puis sécrétés dans la circulation en tant que VLDL.

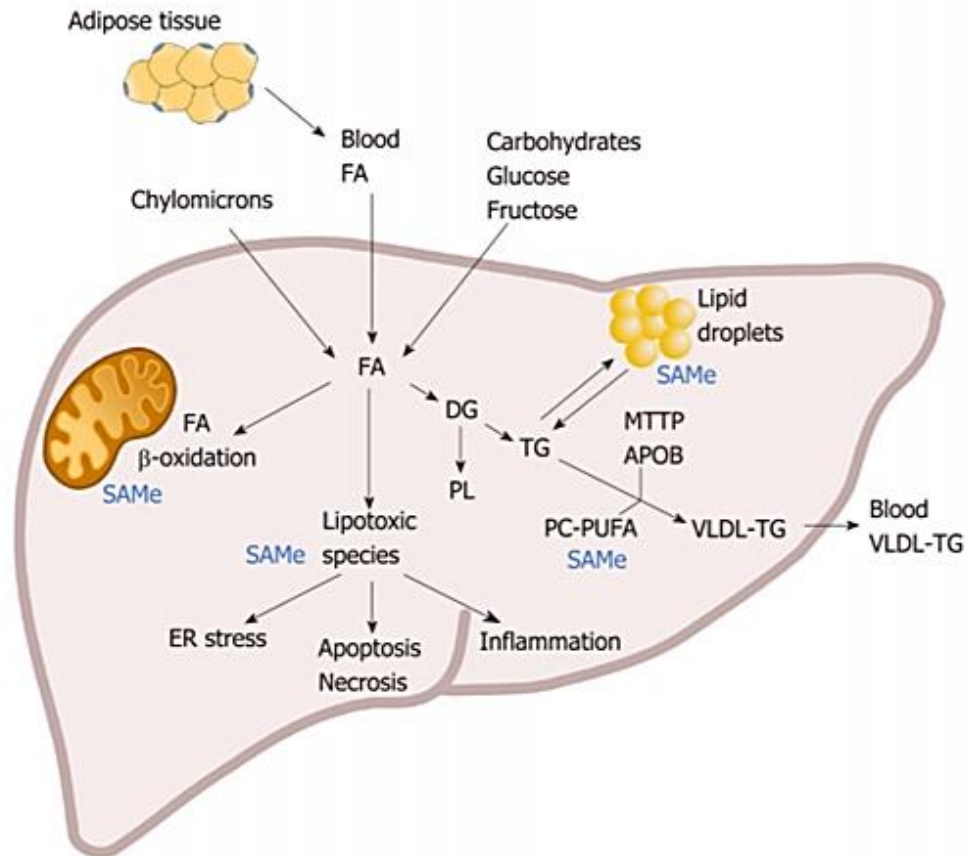


Figure 17: Métabolisme hépatique des lipides ; d'après Mota et al., 2019⁵⁷

La mobilisation des AGs à partir de leur forme de stockage dans le tissu adipeux est sous contrôle de lipases. L'hydrolyse des TG induit la libération des AGs dans le sang puis leur absorption par les hépatocytes. Une autre source d'AGs provient de l'alimentation et de la lipogenèse de novo induite par les carbohydrates. Les AGs sont métabolisés par la β-oxydation mitochondriale ou peroxysomale; ou s'accumulent dans le foie où ils deviennent lipotoxiques. Les AGs peuvent également être modifiés pour la synthèse de lipides complexes comme la phosphatidylcholine (PL), les diglycérides ou les TG. Une partie des TG nouvellement synthétisés peut former des VLDL en combinaison avec l'apoB ce qui permet leur export dans la circulation sanguine. L'ensemble des réactions enzymatiques hépatiques sont régulées par la S-adenosylmethionine (S-AdoMet)

APOB: Apolipoprotein-B; DG: Diglycerides; ER: Endoplasmic reticulum; FA: Fatty acids; MTTP: Microsomal triglycerides transfer protein; PC-PUFA: Phosphatidylcholines containing polyunsaturated fatty acids; PL: Phospholipids; S-AdoMet: S-adenosylmethionine; TG: Triglycerides; VLDL: Very lowdensity lipoproteins

5. Lipotoxicité et impact du métabolisme lipidique dans la NAFLD

Un des mécanismes de la pathogenèse de la NAFLD réside dans le déséquilibre entre la production de triglycérides à partir des acides gras (via l'absorption et l'estérification d'une part des lipides plasmatiques et l'activation de la lipogenèse *de novo* convertissant les substrats glucidiques en TG d'autre part) et leur catabolisme hépatique (soit via la β-oxydation mitochondriale, soit via leur export sous forme de VLDL). Ce déséquilibre production/utilisation favorise l'accumulation de lipides dans le foie et le développement, ainsi que la progression de la maladie³⁵.

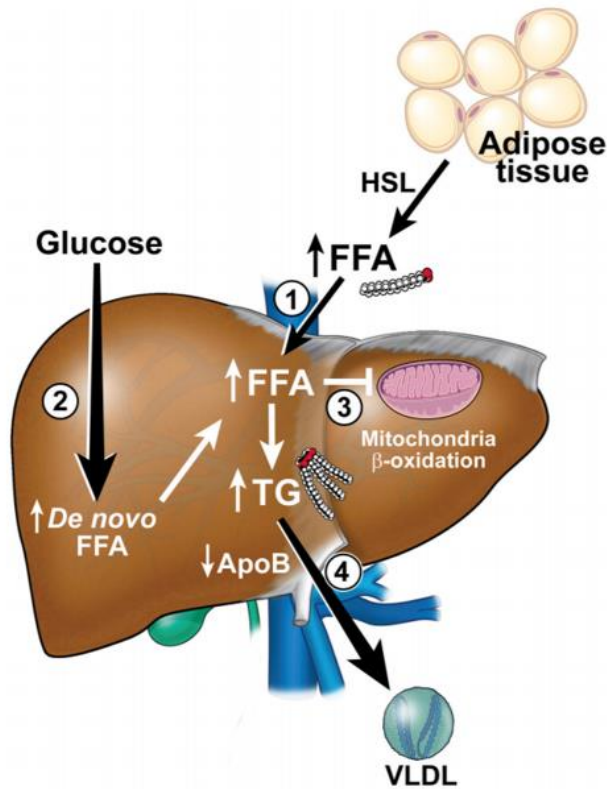


Figure 18: Mécanismes global de la lipotoxicité; d'après Alkhoury et al., 2009⁵⁹

La rétention des lipides dans les hépatocytes peut résulter d'altérations :

1. De l'absorption des AGs
2. de la lipogenèse de novo
3. de l'oxydation mitochondriale
4. des voies permettant l'export des TGs sous forme de VLDL dans la circulation sanguine.

Plusieurs altérations peuvent intervenir simultanément en fonction du stade de la pathologie et son évolution vers la NASH et la cirrhose. FFA, free fatty acids; TG, triglycerides; ApoB, apolipoprotein B; HSL, hormone sensitive lipase

a. Altération de l'absorption des lipides

Dans le foie, les lipides proviennent de 3 sources distinctes :

- AG issus de l'alimentation et apportés sous forme de chylomicrons remnants,
- AG issus de la lipolyse des tissus adipeux,
- Lipogenèse *de novo* via transformation de substrats carbohydrates issus de l'alimentation.

Lors de la NAFLD, le foie reçoit un flot plus conséquent d'AG et de carbohydrates; d'une part en raison d'un régime riche en lipides et en glucides, d'autre part en conséquence de la perte de contrôle insulinique sur la lipolyse du tissu adipeux due à l'installation d'une insulino-résistance périphérique⁵⁴. On estime que 60% des TG formés dans le foie est la résultante du flot d'acides gras libres provenant de la lipolyse des adipocytes ; 15% serait lié à l'apport alimentaire et 25% découlerait de la DNL^{44, 44, 46}.

Chez les patients NAFLD, il a été montré une augmentation du taux de LPL (lipoprotéine lipase) permettant l'hydrolyse des TG en AG libres avant transport hépatique. De même, il semblerait que les protéines de transport hépatique des AG soient également amplifiées facilitant l'entrée des AG dans le foie.³⁵ Ainsi, une augmentation des taux hépatiques des protéines se liant aux acides gras (FABP : Fatty acid binding protein) comme CD36 a été notée chez les mammifères présentant un foie gras ⁴⁴.

b. Implication de la lipogenèse *de novo*

Si chez l'individu sain, la DNL n'est utilisée que sporadiquement pour la synthèse de triglycérides, il a été mis en évidence que lors de la NAFLD, la DNL est accrue en post-prandial et est un des mécanismes majeurs de l'accumulation de TG⁴⁶. L'impact alimentaire est prépondérant dans cette stimulation de la DNL en particulier les régimes riches en carbohydrates et en fructose. En parallèle, l'insulinorésistance hépatique sélective stimule SREBP1c et ChREBP et donc la DNL. Chez l'homme, on observe une augmentation de ces deux gènes chez les patients NAFLD. De même dans le modèle murin, l'augmentation de SREBP1c et ChREBP est associée à une augmentation massive de la stéatose et *a contrario*, l'inhibition de ces deux médiateurs empêche en partie la stéatose hépatique.

FATTY LIVER DISEASE

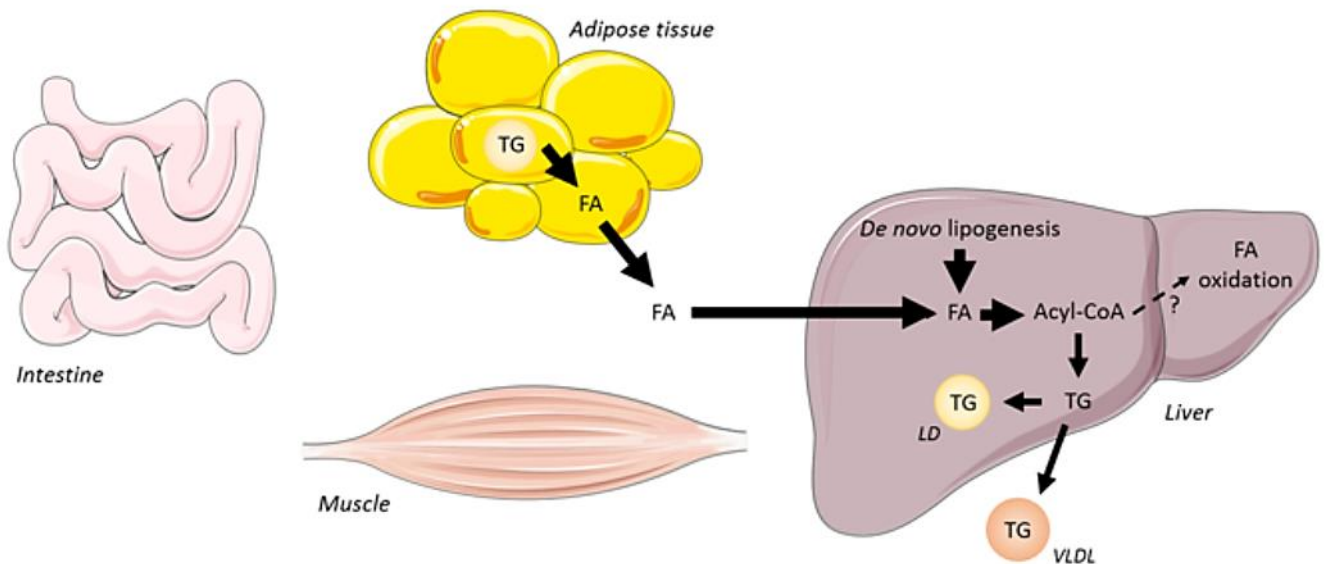


Figure 19: Lipogenèse *de novo* et NAFLD; d'après Alves-Bezerra et al., 2019 ⁴³

En cas de surnutrition ou d'insulino-résistance, les taux hépatiques d'AGs s'accroissent d'une part en raison d'une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes ce qui induit une augmentation d'AGs dans la circulation sanguine; d'autre part à cause d'une augmentation de la DNL. Les AGs présents en excès ne peuvent plus être consommés par oxydation et sont dirigés à la place vers la synthèse de TG. Cela entraîne une augmentation du stockage hépatique des TG et une surproduction des VLDL. FA: fatty acid; TG: triglycerides; LD: lipid droplet

c. Défaut de sécrétion des VLDL

Chez le patient sain, le rapport entre le taux de triglycérides intrahépatique (IHTG) et le taux de sécrétion des VLDL-TG dans la circulation sanguine sont étroitement liés. On observe ainsi une augmentation de l'export de TG sous forme de VLDL proportionnellement à l'augmentation de TG hépatiques. Chez les patients NAFLD, il n'y a plus de corrélation entre le taux IHTG et la proportion de VLDL sécrétées, le taux de sécrétion des VLDL atteignant rapidement un plateau malgré l'accumulation croissante de TG dans les hépatocytes⁵⁵.

Le défaut de sécrétion des VLDL dans la circulation sanguine peut s'expliquer en partie par une altération des gènes codants pour les différents acteurs impliqués dans la formation et la libération des lipoprotéines et notamment l'apoB, l'apoCIII et la MTTP⁵³.

Chez les patients NAFLD, un stress du RE dû à une exposition prolongée aux acides gras entraîne la dégradation post-translationnelle de l'apoB100, diminuant donc sa sécrétion et impactant la formation des VLDL. Par ailleurs, il semblerait que le stade de la maladie soit un déterminant essentiel dans la capacité d'assemblage et d'export des VLDL-TG. Ainsi, il a été montré que les patients au stade stéatose présentaient des taux plus élevés en apoB100 et MTTP que les patients NASH, marquant une détérioration du processus avec l'avancée de la fibrose.

La stagnation d'export de VLDL-TG dans la circulation sanguine chez les patients NAFLD pourrait également être expliquée par la composition de ces molécules. Il apparaît en effet que lors de la stéatose, les VLDL formées soient plus riches en contenu en TG. Or, les VLDL très larges ne peuvent traverser les pores sinusoidaux de par leur diamètre causant ainsi leur accumulation *in situ*⁴⁷.

d. Accumulation d'espèces lipidiques cytotoxiques

La lipotoxicité se définit comme l'accumulation d'espèces toxiques lipidiques conduisant à une dysfonction des organites, à une cytotoxicité et à la mort cellulaire⁴⁶. Lors de la NAFLD, l'accumulation de certaines espèces lipidiques ainsi que l'apport accru de nutriments modifient notamment le fonctionnement du RE et de la mitochondrie favorisant la mise en place d'un environnement inflammatoire délétère pour la cellule⁵⁶. Les lipides participent à la signalisation cellulaire et leur accumulation inappropriée peut résulter en une modulation de voies de signalisation métaboliques et inflammatoires. La lipotoxicité n'est pas

réduite au foie mais concerne l'ensemble des organes impliqués dans la NAFLD dont le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique.

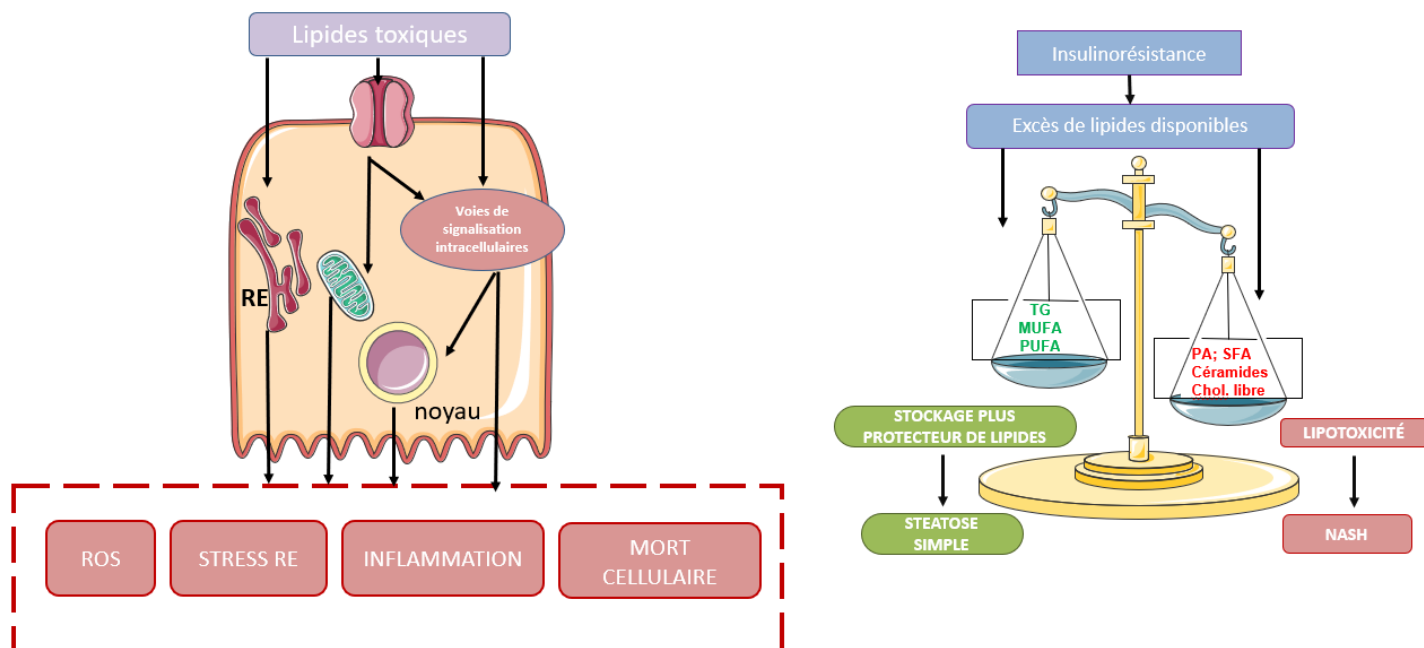


Figure 20: Accumulation d'espèces lipotoxiques et impact sur la progression de la NAFLD; d'après Marra et al., 2018 ⁵⁶

Les lipides toxiques modifient la biologie et les fonctions des organites intracellulaires (RE et mitochondrie). Ils peuvent également induire des voies de signalisations intracellulaires aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Leur accumulation dans l'hépatocyte induit la production de ROS, un stress du RE, une inflammation et entraîne la mort des cellules. Un excès de lipides arrivant au foie et notamment sous forme d'AG libres dérivent principalement de la lipolyse du tissu adipeux qui ne répond plus au signal insulinique. Dans le foie, les formes libres comme l'acide palmitique (PA), les AG saturés (SFA), les céramides et le cholestérol libre sont lipotoxiques et induisent des lésions cellulaires. Le stockage des AGs sous forme de TG représentent en revanche une forme neutre, non cytotoxique. La progression de la NAFLD en NASH est en partie dépendante de la balance entre espèces lipidiques toxiques et espèces moins dangereuses.

➤ Triglycérides

Les TG sont le marqueur de la NAFLD et les composants lipidiques majoritaires des gouttelettes lipidiques qui permettent leur stockage. Bien que le taux de TG accumulés dans le foie soit un indice du stade de NAFLD, il a été montré que cette espèce lipidique revêtait un caractère bénéfique dans la pathologie. Des lignées cellulaires hépatocytaires ont ainsi été exposées soit à l'oléate (acide gras insaturé), soit au palmitate (acide gras saturé). Les cellules traitées par l'oléate montraient une augmentation plus importante de TG. En revanche, les cellules traitées au palmitate présentaient des taux d'apoptose élevés. Le palmitate est associé à une activation de PPAR α et une altération de la signalisation insulinique ce qui déclenche l'activation de la voie JNK et des caspases induisant une mort cellulaire⁵⁷. Par ailleurs, si on bloque la synthèse de TG dans le foie en inhibant l'action de la DGAT2, enzyme catalysant la dernière étape de formation des TG, on assiste bien à une diminution de la

stéatose mais également au développement d'un stress oxydant, de l'inflammation, à une augmentation de la production de ROS et au développement de la fibrose^{58, 59, 60}. Les TG, lipides neutres, sont donc une forme inerte de stockage des lipides qui certes marquent la stéatose et concourent à l'altération des capacités métaboliques du foie mais en limitant la production de lipides toxiques temporisent l'apparition de la NASH et le développement de la fibrose⁵⁶.

➤ Espèces lipotoxiques

Les AG libres internalisés dans les organes via CD36 sont classés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée et du nombre de doubles liaisons carbone-carbone. On distingue les acides gras saturés comme le palmitate et le stéarate et les acides gras insaturés (monoinsaturés ou polyinsaturés). Les AG saturés proviennent largement de l'alimentation et de la DNL et sont augmentés dans la NAFLD tandis que les AG insaturés tendent à être diminués. Le pouvoir cytotoxique des AG saturés a été mis en évidence dans de nombreuses études et notamment leur capacité à déclencher des signaux apoptotiques et des phénomènes inflammatoires⁵⁶. *A contrario*, les acides gras mono- et poly-insaturés sont considérés comme protecteurs et associés à une diminution de la stéatose. Pourtant, à l'instar des TG, si les acides gras polyinsaturés protègent la cellule des signaux pro-apoptotiques, leur action de régulateurs de la voie JNK entraîne à terme une augmentation de médiateurs pro-inflammatoires induisant une fibrose.

Un autre groupe de lipides joue un rôle prépondérant dans la pathogenèse et la progression de la NAFLD. Ce sont les céramides, impliqués dans l'altération de nombreuses fonctions métaboliques, ils participent notamment au développement de l'insulinorésistance, du stress oxydant, et de la mort cellulaire⁵⁶. Les céramides appartiennent à la famille des sphingolipides et sont des composants majeurs de la structure de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Les céramides peuvent être synthétisés selon trois procédés parmi lesquels on retrouve l'hydrolyse de la sphingomyéline des membranes cellulaires via la N-SMase (neutral sphingomyélinase) dont l'expression est augmentée lors de l'inflammation, et la synthèse *de novo* à partir de substrats de l'alimentation. La synthèse *de novo* des céramides peut être la résultante du stress oxydant, d'une charge métabolique en sérine ou de la présence de LDL oxydées. L'enzyme limitante de cette synthèse est la sérine palmitoyl-CoA

transférase (SPT) ayant une très grande affinité pour le palmitoyl-CoA, forme activée de l'acide palmitique. Un régime riche en graisses saturées est donc vecteur de la synthèse *de novo* des céramides⁵⁷. De plus, l'activité de la SPT peut être stimulée par des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL1 β ou le stress oxydant. Enfin les céramides peuvent réguler positivement l'expression de gènes pro-inflammatoires via l'action sur la voie NF- κ B. Ce rétrocontrôle positif amplifie et perpétue un contexte inflammatoire. Enfin les céramides peuvent également interagir avec le TLR4 (toll-like receptor 4) et participer à l'insulinorésistance engendrée par la cascade inflammatoire initiée par l'activation de ce récepteur de l'inflammation⁴⁶. L'accumulation des céramides promeut le stress oxydant favorisant la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) médiateurs pro-apoptotiques et le recrutement de cellules pro-inflammatoires dans le foie ce qui aggrave l'inflammation *in situ*. Au-delà d'une action hépatique, les céramides ont également une action sur les organes périphériques et contribuent au développement de l'insulinorésistance périphérique.

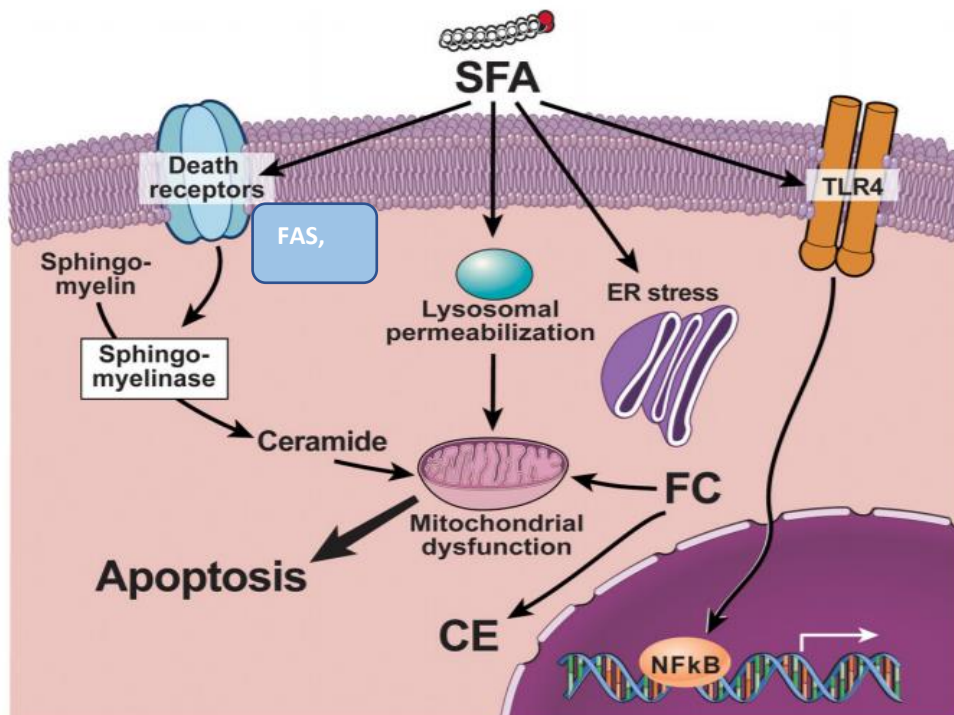


Figure 21: Rôles des céramides, des acides gras saturés et du cholestérol libre dans l'apoptose et la NAFLD; d'après Alkhouri et al., 2018⁵⁹
 Les AGs libres activent plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et entraînent notamment l'augmentation du nombre de récepteurs de mort comme Fas et TRAIL au niveau de la membrane plasmique. On assiste en parallèle à une augmentation de la perméabilité lysosomale, à l'induction d'un stress du RE, à un dysfonctionnement mitochondrial ce qui active d'autres voies apoptotiques. Les lipides toxiques peuvent également activer le récepteur TLR4 dont la signalisation induit l'augmentation d'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Enfin, le cholestérol libre et les céramides peuvent entraîner aussi un dysfonctionnement de la mitochondrie et activer ainsi les voies apoptotiques mitochondriales
 FFA: free fatty acids; SFA: saturated fatty acids; FC: free cholesterol; CE: cholesteryl-ester; ER: endoplasmic reticulum

Un autre acteur lipidique de la pathogenèse de la NAFLD est le cholestérol libre. De nombreuses études montrent qu'une altération du métabolisme du cholestérol joue un rôle dans la progression de la pathologie via notamment une accumulation de cholestérol libre suite à sa dé-estérification et à un défaut d'exportation de ce dernier. L'un des mécanismes consiste en une accumulation du cholestérol dans la membrane mitochondriale altérant la fluidité de cette dernière et conduisant à l'oxydation du glutathion. La déplétion en glutathion stimule la voie Fas/FasL induisant la mort cellulaire ⁴⁶. De plus l'accumulation de cholestérol dans la mitochondrie déclenche des processus pro-inflammatoires par activation des voies de signalisation JNK dépendantes. La synthèse du cholestérol est sous contrôle d'une enzyme clé la HMGCoA reductase régulée par une isoforme de SREBP : SREBP2 ⁵⁷. Dans la NASH on assiste à une augmentation de l'expression de SREBP2 qui induit une augmentation de l'activité de l'HMGCoA et donc favorise la synthèse de cholestérol libre ⁵⁷. L'expression de SREBP2 est également augmentée par l'insulinorésistance et peut agir sur la mitochondrie en inhibant la β -oxydation des AG⁶¹. Le cholestérol libre interagit avec différents types cellulaires comme les cellules de Kupffer et les cellules stellaires hépatiques favorisant le relargage de cytokines pro-inflammatoires et le développement de la fibrose notamment via la stimulation de la signalisation fibrogénique TGF β ^{35, 46, 62}.

e. Impact de la lipotoxicité sur les organites

L'accumulation d'espèces lipotoxiques conduit à un dysfonctionnement des composants de la cellule ce qui génère une lipoapoptose. Parmi les organites impactés par cet excès de lipides cellulaires, le RE et la mitochondrie sont des acteurs majeurs dans la signalisation apoptotique.

➤ Stress du RE

Le RE est le support de nombreuses fonctions vitales pour la cellule dont la synthèse, la maturation, le couplage et le transport des protéines. Il joue également un rôle dans le maintien de l'homéostasie calcique, phénomène primordial de la signalisation cellulaire. Enfin, le RE participe à la synthèse lipidique⁵⁷. L'ensemble des fonctions du RE est sous le contrôle d'une voie de signalisation intracellulaire adaptative appelée « unfolded protein response » UPR. En présence d'éléments déclencheurs comme des précurseurs inflammatoires, le RE passe en état de stress ce qui induit l'activation de l'UPR qui réétablit l'homéostasie du RE. Si

l'UPR est stimulée de manière prolongée elle active différentes voies de signalisation : IRE1, PERK et ATF6, aboutissant à une cascade pro-apoptotique et à la mort cellulaire^{46, 57}. IRE1 peut notamment favoriser l'apoptose par activation de la voie de signalisation JNK, mais également le développement de la stéatose par diminution de la β -oxydation des AG. PERK et ATF6 sont quant à eux capables d'induire l'expression de CHOP (CCAAT-enhancer binding protein homologous protein 1) qui supprime l'expression de gènes clés dans l'homéostasie lipidique et donc favorise le développement de la stéatose. CHOP est également impliqué dans la régulation positive du récepteur de mort TRAIL et de la protéine BIM, deux acteurs de la mort cellulaire⁵⁷

De plus, une augmentation chronique des apports alimentaires et un taux élevé d'AG saturés conduisent à une altération de l'homéostasie calcique dans la lumière du RE⁴⁶. La dérégulation de la synthèse lipidique induit une modification de la composition en phospholipides dans la cellule qui entraîne une déplétion des stocks de calcium dans le RE et de fait une altération du couplage protéique. La perturbation des concentrations calciques entraîne à terme l'apoptose des cellules. Par ailleurs, l'insulinorésistance contribue également à la genèse du stress du RE. A terme, le stress du RE favorise la progression de la NAFLD vers la NASH via la production d'espèces pro-oxydantes et pro-apoptotiques.

➤ Altérations des fonctions mitochondriales

La stéatose hépatique s'accompagne d'une insulinorésistance, d'une augmentation de la β -oxydation et d'un stress oxydant. Lors de la progression de la NAFLD en NASH, une altération des fonctions mitochondriales apparaît avec des modifications structurelles de la mitochondrie. La dysfonction mitochondriale impacte différentes voies dont la β -oxydation des AG et la respiration de la chaîne mitochondriale⁴⁶. Ces voies de signalisation jouent un rôle prépondérant dans l'adaptation de l'organisme à une charge augmentée en AG lors du développement de la NAFLD. L'altération de l'activité mitochondriale stimule la production de ROS et d'intermédiaires lipidiques cytotoxiques⁵⁷.

Dans la progression de la NAFLD vers la NASH, un dialogue s'établit entre le RE et la mitochondrie. L'altération respective de ces organites favorise et entretient l'insulinorésistance, la lipotoxicité, le stress oxydant et aboutit à la production de ROS. L'ensemble de ces signaux engendre le développement d'un contexte inflammatoire résultant en l'apoptose des cellules et à terme au développement de la fibrose.

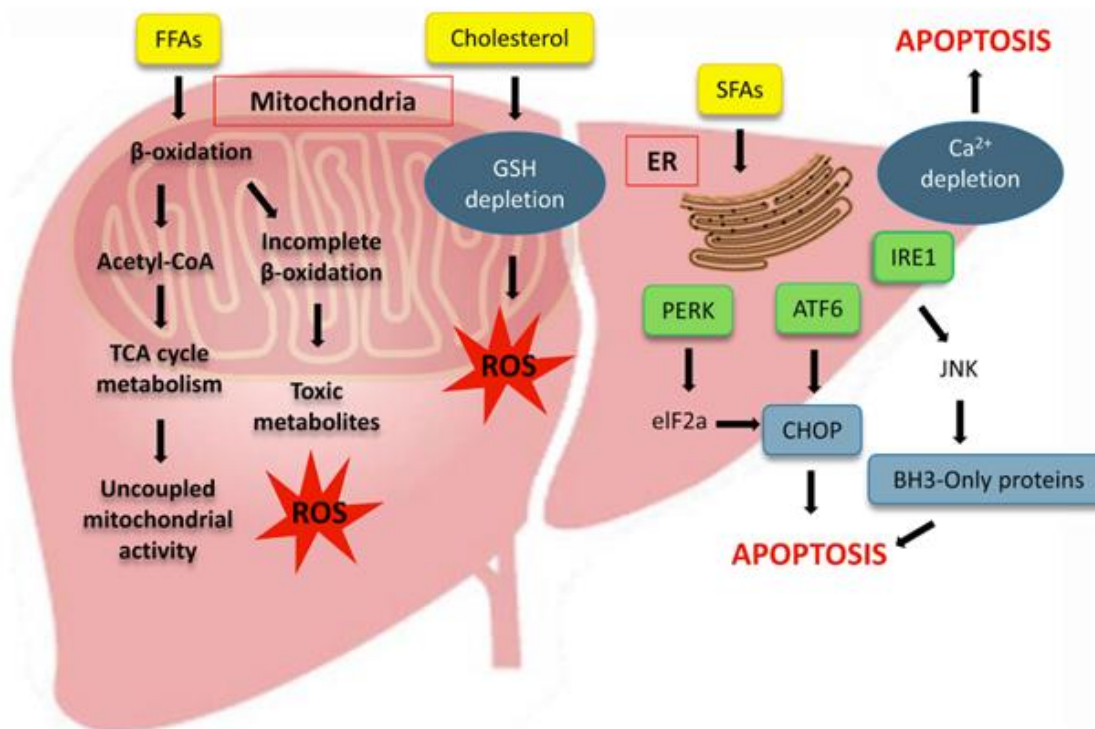


Figure 22: Altération du réticulum endoplasmique (RE) et de la mitochondrie dans la NAFLD; d'après Svegliati-Baroni et al., 2019⁴⁶

Un excès d'AG libres induit la synthèse d'acétyl-CoA via un processus métabolique qui peut impacter le cycle de Krebs et induire la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une β -oxydation incomplète des AG en excès favorise l'accumulation d'espèces toxiques dont les AG saturés. L'accumulation mitochondriale de cholestérol joue également un rôle important dans la lipotoxicité et entraîne une déplétion en GSH et donc un stress oxydant. Les AG saturés favorisent le stress du RE en activant les voies de signalisation intra-cellulaires PERK, ATF6 et IRE1. La stimulation de PERK entraîne l'activation de molécules pro-apoptotiques telles que CHOP. CHOP est également un substrat d'ATF6. La voie de signalisation impliquant IRE1 est dépendante de l'activation de JNK qui induit l'expression de protéines pro-apoptotiques spécifiques : "BH3-only proteins".

L'insulinorésistance périphérique et hépatique ainsi que la lipotoxicité induite par l'accumulation d'espèces lipidiques délétères sont des facteurs déclencheurs d'une inflammation chronique de bas grade non seulement dans le foie mais également dans le tissu adipeux blanc. Cet état inflammatoire est déterminant dans la progression de la NAFLD vers la NASH en favorisant le développement de la fibrose hépatique.

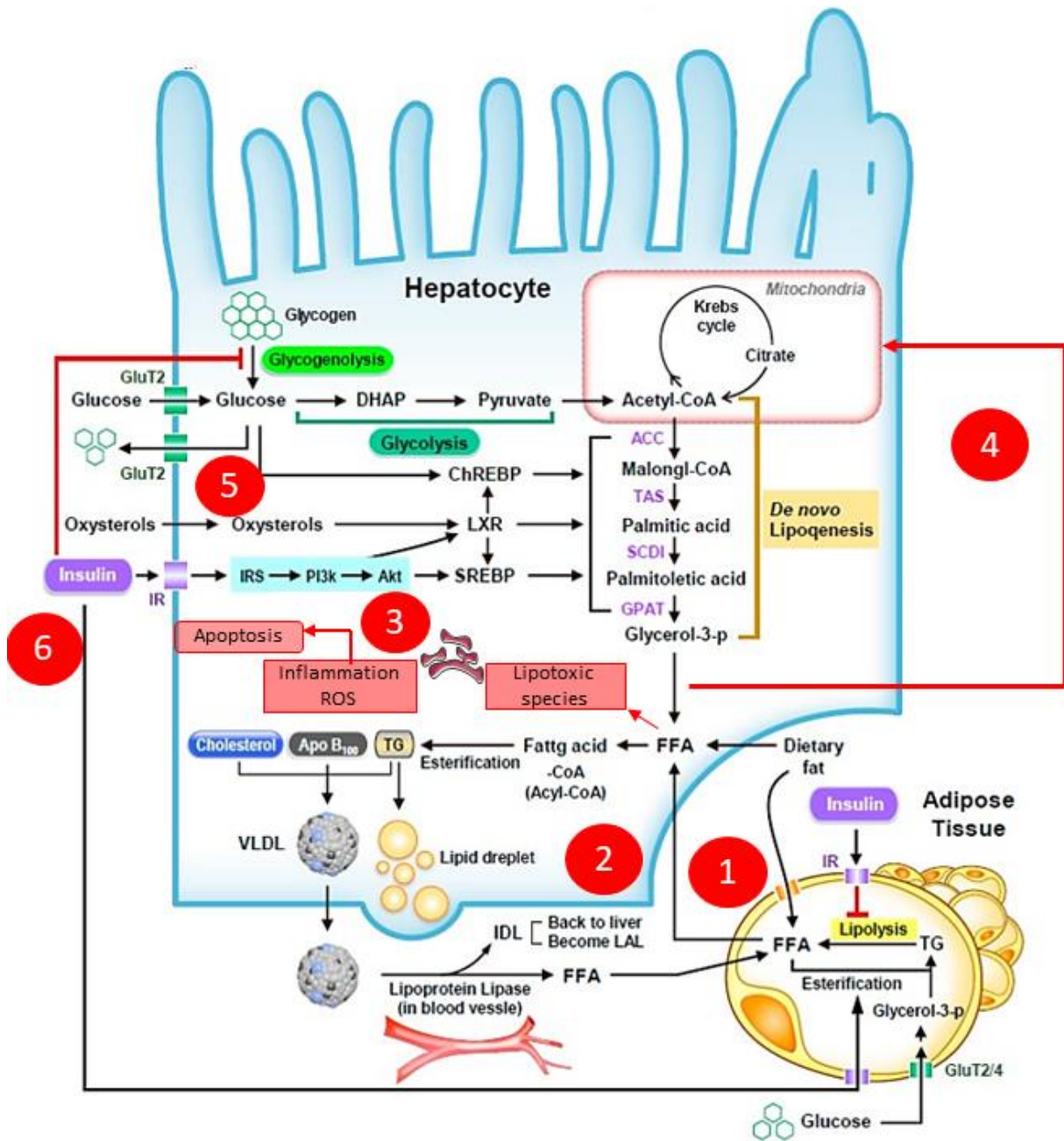


Figure 23: Mécanismes croisés de la lipotoxicité et de la glucotoxicité dans la pathogenèse de la NAFLD; d'après Chao et al. 2019³³

L'expansion anormale du tissu adipeux entraîne une insulino-résistance adipocytaire. L'inhibition de la lipolyse est levée ce qui entraîne une augmentation du flux d'AGs libre dans la circulation sanguine à destination du foie.

1. Dans l'hépatocyte, on assiste à une estérification des AGs sous forme de TG. En parallèle on assiste à une altération de la formation et de la sécrétion des VLDL.
2. Lorsque la pathologie progresse, des espèces lipidiques toxiques s'accumulent et induisent des cascades de signalisation et un stress du RE favorisant la mise en place d'un contexte inflammatoire et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui entraîne un phénomène apoptotique.
3. Les AGs toxiques altèrent également le fonctionnement de la mitochondrie entraînant des cascades pro-apoptotiques.
4. En parallèle, on assiste à une augmentation de l'apport en carbohydrates, conséquence de l'insulino-résistance musculo-squelettique. L'hyperglycémie chronique favorise l'insulino-résistance hépatique en parallèle de la lipotoxicité. Cela stimule la glycogenolyse normalement inhibée par le signal insulinique. Le glucose va servir de précurseur à la lipogenèse de novo via la stimulation de ChREBP ce qui stimule la stéatose hépatique.

5. *L'insulinorésistance périphérique est dite sélective: en effet si l'inhibition de la gluconeogenèse est levée, SREBP sous contrôle de l'insuline reste induit lors de la NAFLD. Le maintien de l'activation de SREBP stimule également la DNL et l'expression des gènes hépatiques de la lipogenèse (ACC, FAS et SCD1) renforçant la stéatose hépatique. La glucotoxicité et la lipotoxicité agissent de concert dans la pathogenèse de la NAFLD.*

C. Foie, inflammation et immunité dans la NAFLD

Le foie est un organe majeur de l'organisme intervenant dans de nombreux processus de synthèse, de stockage et de détoxification et permet l'exploitation des nutriments issus de l'alimentation ainsi que la transformation d'un certain nombre de substances en produits inoffensifs avant de les éliminer par excrétion biliaire. Il joue également un rôle prépondérant dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, le foie reçoit 1,5 L de sang par minute provenant majoritairement de l'intestin via la circulation portale. Il est donc particulièrement exposé aux antigènes alimentaires, aux produits bactériens appelés PAMPS (pathogen associated molecular patterns) tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou la flagelline voire aux bactéries elles-mêmes qu'elles soient commensales ou pathogènes. Le foie est donc le siège de processus immunitaires complexes : il doit d'un côté présenter une activité tolérogène pour empêcher un emballement de l'immunité face aux signaux qu'il reçoit de manière perpétuelle, et de l'autre être capable de répondre efficacement en cas de signal inhabituel témoignant d'une agression pathogénique ⁶³. Pour remplir cette fonction, le foie est doté de nombreuses cellules immunitaires. On estime ainsi que 45% des cellules non hépatocytaires sont des cellules de l'immunité. Parmi ces cellules, 20% correspondent aux cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie et 25% aux lymphocytes (B, T et NKT) et aux cellules NKT ⁶⁴.

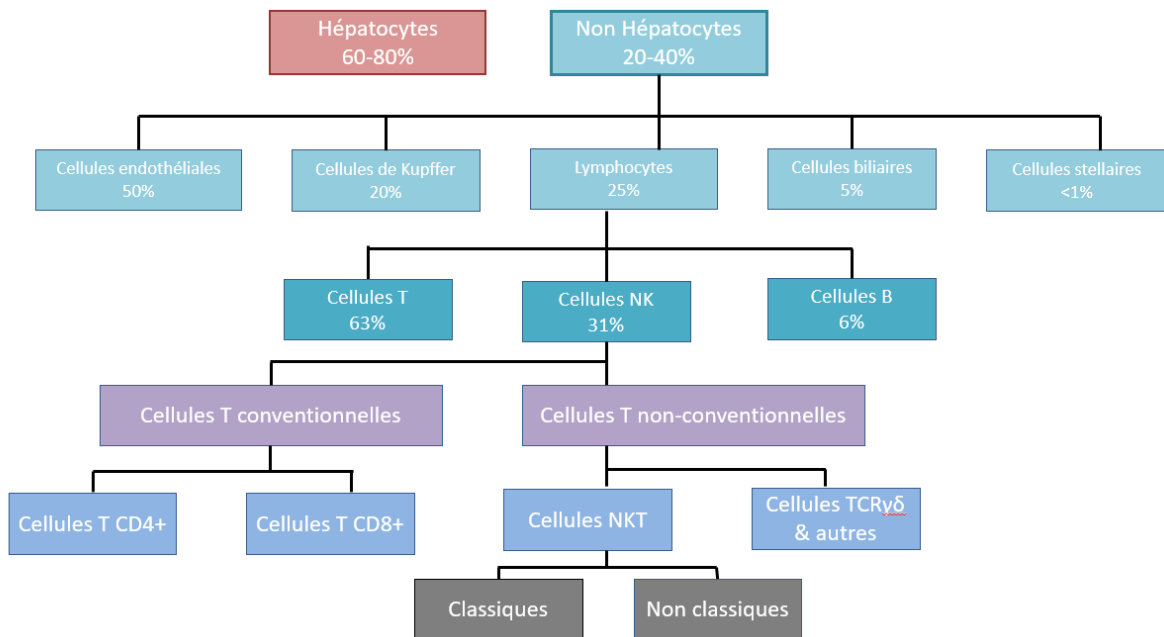


Figure 24: Composition des cellules immunitaires dans le foie; d'après Racanelli et al., 2006 ⁶⁴

Le sang arrive au foie par la veine porte et va traverser les sinusoides hépatiques puis quitte le foie par la veine centro-lobulaire. Au sein des sinusoides, les hépatocytes interagissent avec les cellules immune présentes.

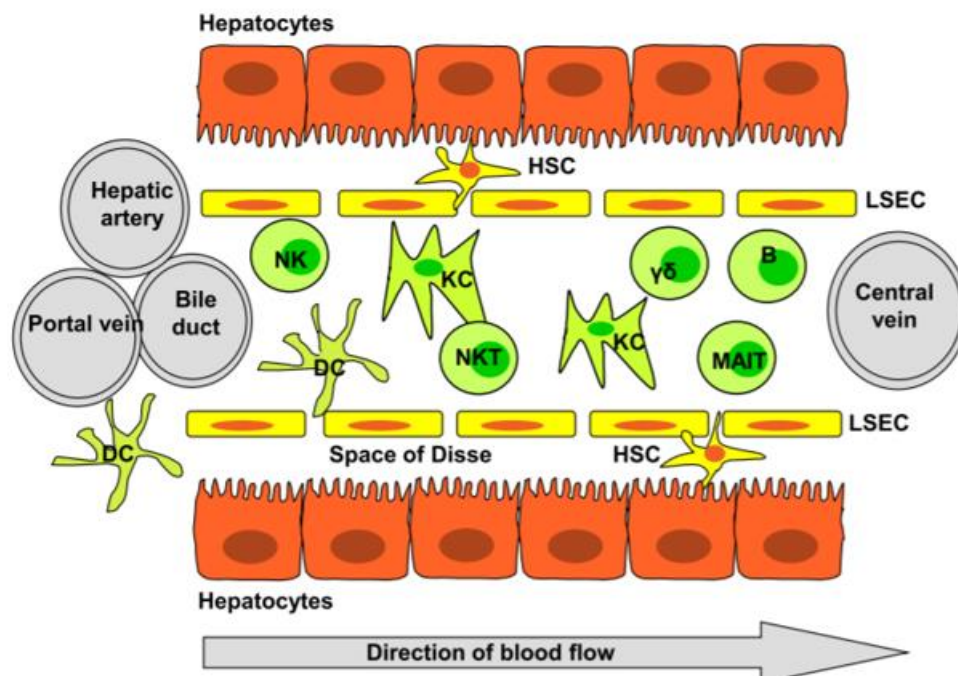


Figure 25: Localisation des cellules dans le parenchyme hépatique; d'après Doherty et al., 2016 ⁶³

Le sang atteint le foie par la veine porte et s'écoule à travers un réseau sinusoidal puis quitte le foie via la veine centrolobulaire. Les hépatocytes s'organisent en travées et les sinusoides hépatiques sont bordés d'une couche de cellules endothéliales hépatiques (LSEC). Les LSECs et les hépatocytes sont séparés par l'espace de Disse. Dans cette zone, les hépatocytes interagissent avec le sang circulant qui contient des cellules immunitaires: cellules dendritiques (DC), cellules de Kupffer (KC),

cellules natural killer (NK) et natural T killer (NKT). D'autres cellules sont présentes comme les MAIT (mucosal-associated invariant T) et les cellules $\gamma\delta$.

1. Cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer jouent un rôle central dans le développement de la NASH. Elles se situent au sein des sinusoides du parenchyme hépatique et constituent près de 10% des cellules totales du foie. Ces macrophages sont dotés de marqueurs membranaires tels que F4/80 et CD68. Les macrophages F4/80⁺CD68⁺ sont notamment impliqués dans la production de ROS. Les cellules de Kupffer induisent le recrutement de cellules immunes inflammatoires et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires.

En réponse à différents stimuli, les macrophages se polarisent et acquièrent soit une activité pro-inflammatoire M1, soit une activité anti-inflammatoire M2 en fonction des agents qui viennent les exciter. Les macrophages M2 sont classés en fonction des signaux inducteurs : lorsqu'ils sont stimulés par l'IL-4 ou l'IL-13, les macrophages s'orientent vers un profil M2a ; à l'inverse une stimulation par les complexes immuns associés aux ligands des TLR ou par l'IL-1 β orientent les macrophages vers un profil M2b. Enfin une induction par l'IL-10 oriente vers un profil M2c.^{65, 66} Il est à noter que la classification M1, M2 et de leurs sous types initialement issue de phénotypes induits *in vitro*, se trouve parfois plus complexe lorsque les macrophages sont issus de tissus murins ou humains. On observe ainsi dans ces macrophages tissulaires des gradients d'expression des marqueurs membranaires ne se résumant pas simplement à une présence ou absence des différents profils ce qui complique la classification initiale.

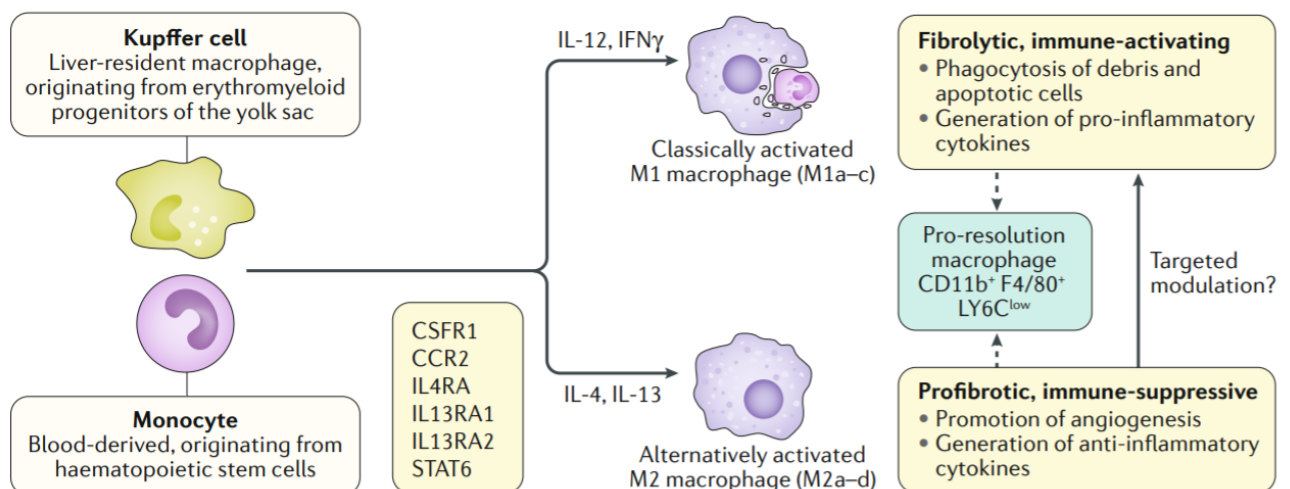


Figure 26: Polarisation des macrophages; d'après Kazankov et al., 2019³⁹

Les macrophages vont se polariser selon deux grands phénotypes majeurs M1 ou M2 qui présentent chacun des sous-phénotypes: M1a-c et M2a-d. Les M1 sont activés de manière classique tandis que les M2 s'activent de manière alternative. Le phénotype M1 ainsi que certains macrophages M2 favorisent l'inflammation et le développement de la fibrose dans la NASH. Au contraire, plusieurs types de macrophages M2 permettent la cicatrisation des tissus par une action pro-fibrotique et immunosuppressive.

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CSFR1, macrophage colony-stimulating factor receptor 1; IFN γ , interferon- γ ; IL4RA, interleukin-4 receptor subunit- α ; IL13RA, interleukin-13 receptor subunit- α ; LY6C, lymphocyte antigen 6C; STAT6, signal transducer and activator of transcription 6

Le rapport M1/M2 régule l'inflammation *in situ*³⁰. La libération de nombreux médiateurs orientant vers une polarisation M1 favorise le développement de la NASH via le recrutement de cellules de l'immunité pro-inflammatoires et l'activation de la fibrogenèse. La stéatose hépatique modifie la structure des hépatocytes induisant le relargage de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'activation des cellules de Kupffer³⁹. Les hépatocytes lipotoxiques sont notamment capables de libérer des vésicules extracellulaires constituées de chimiokines comme CXCL10 ou de ligands pro-apoptotiques comme TRAIL qui facilitent le recrutement et l'activation des macrophages M1. La lipotoxicité intrahépatique entraîne également la libération de ROS qui stimulent TNF α et par voie de conséquence activent les cellules de Kupffer. Les macrophages hépatiques sont donc activés de manière autocrine et paracrine et exercent une activité pléiotropique qui favorise le développement de la pathologie.

Les cellules Kupffer polarisées sécrètent à leur tour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires tels que le CCL2 et CCL5 qui promeuvent l'accumulation de lipides dans le foie, impactant la régulation de l'homéostasie lipidique intracellulaire et permettant l'infiltration par des cellules immunes³⁰. CCL2 se lie au récepteur CCR2 ce qui induit le recrutement de monocytes dans le foie et le tissu adipeux, stimulant le développement de l'insulinorésistance et de la stéatose. CCL5 se lie à CCR1, CCR3 et CCR5 et induit la migration de cellules immunes (cellules T, monocytes, neutrophiles et cellules dendritiques). La voie de signalisation activée par CCR5 est impliquée dans le développement de la fibrose hépatique. Ces deux voies (CCR2 et CCR5) sont augmentées dans les modèles de NAFLD et de NASH³⁰.

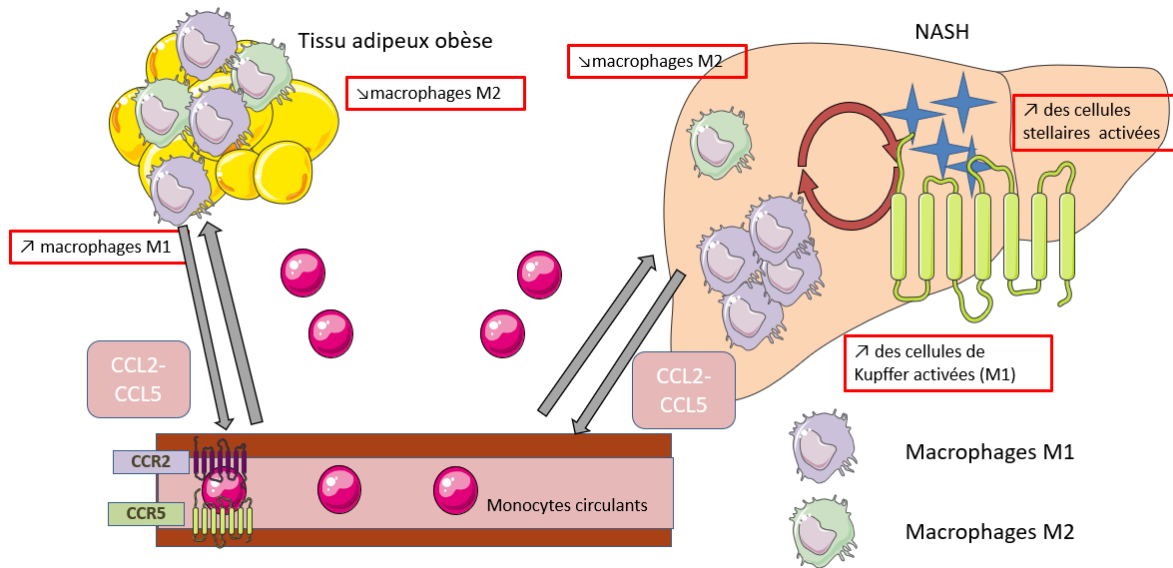


Figure 27: Implication de la voie CCR2 et CCR5 dans le développement de l'inflammation, d'après Kitade et al., 2017³⁰

Dans l'obésité, le tissu adipeux s'accroît drastiquement et les monocytes dérivés de la moelle osseuses sont recrutés à partir de la circulation sanguine, majoritairement via une signalisation CCR2. La voie de signalisation CCR5 joue également un rôle important dans le recrutement des monocytes du TA. Les macrophages infiltrés au sein du tissu adipeux lors de l'obésité passent d'un phénotype M2 à un phénotype M1. Ces derniers vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires induisant le développement de l'insulinorésistance, d'une dysfonction des adipocytes et participent à l'inflammation systémique. Dans le foie gras, le recrutement et l'activation des macrophages contribuent au développement de l'inflammation hépatique ce qui participe à l'activation des cellules stellaires.

Deux autres cytokines pro-inflammatoires libérées par les macrophages sont le TNF α et l'IL-1 β : ces deux médiateurs agissent sur le développement de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose. IL-1 β induit notamment une diminution de l'expression des gènes cibles de PPAR α et de l'oxydation des AG. PPAR α est reconnu comme ayant une action protectrice dans la stéatose hépatique en favorisant l'oxydation des AG par la mitochondrie. L'accumulation de lipides sous forme d'acides gras libres est favorisée dans les hépatocytes et conduit au recrutement de neutrophiles, éléments déclencheurs de l'activation de NF κ B. La voie de signalisation sélectionnée mobilise les cellules stellaires hépatiques (HSCs) et aboutit au déclenchement et à la propagation de la fibrose. Les HSCs peuvent également exercer leurs propriétés fibrogéniques via une stimulation par l'IL-6 et le TGF β , cytokines dérivées, entre autre des macrophages.

Au contraire, les macrophages M2 induisent l'apoptose des macrophages M1 via la caspase 3, mécanisme protecteur dans la NAFLD. Dans la NAFLD, le ratio M1/M2 est augmenté montrant que la polarisation des macrophages joue un rôle prépondérant dans l'aggravation de la pathologie. Cependant, chez certains patients NASH, une augmentation des marqueurs de macrophages M2 a été objectivée dénotant une action perverse de ces macrophages anti-inflammatoires. A un certain stade, leur activation alternée en réponse à des vagues

inflammatoires successives pourrait en effet être vecteur de la fibrose en favorisant la réparation tissulaire hépatique³⁹. Les macrophages M2c jouent un rôle primordial dans la suppression de la réponse immunitaire, favorisent le remodelage tissulaire et ont été impliqués dans de nombreux processus tumoraux^{67, 68}. La sécrétion de haut taux d'IL1 β induit le développement de la fibrose. En effet, IL-1 β entraîne une diminution de l'expression des gènes cibles de PPAR α et par conséquent la β -oxydation, et favorise l'accumulation des lipides hépatiques. Cela entraîne un recrutement des neutrophiles avec activation de certains acteurs de l'inflammation comme la voie NF κ B dans les cellules stellaires du foie stimulant leur potentiel fibrogénique³⁹. Les macrophages sont également impliqués dans la physiopathologie du CHC, complication sévère de la NAFLD/NASH. Dans le CHC on retrouve en effet une augmentation de la densité de cellules appelées TAMs (tumor-associated macrophages) dont les caractéristiques correspondent à celles des macrophages M2. Ces TAMs présentent de nombreuses fonctions attribuées au M2 dont la promotion de l'angiogenèse, le remodelage de la matrice et la suppression de la réponse immunitaire adaptative^{1 68}.

L'inflammation hépatique est de plus dépendante d'acteurs comme les TLR et l'inflammasome NLRP3 qui favorisent le processus inflammatoire en impliquant le système immunitaire non spécifique. TLR4, présent sur les cellules de Kupffer peut être activé par les AG libres entraînant une cascade de réactions pro-apoptotiques⁴. TLR9 est également impliqué dans la progression de la NAFLD en NASH, son activation entraînant la sécrétion de

haut taux d'IL1 β par les cellules de Kupffer. D'une part l'IL1 β stimule les HSCs et promeut la fibrose, d'autre part il induit l'inflammation hépatocytaire⁶⁹.

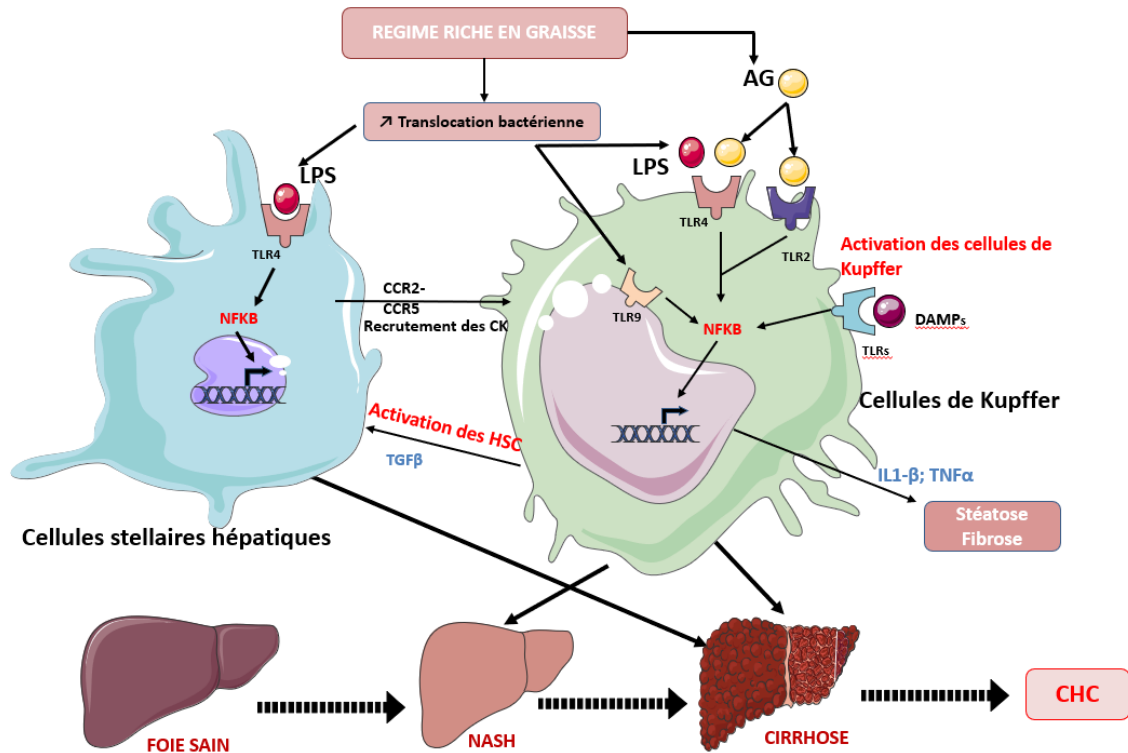


Figure 28: Rôle des Toll-like receptors (TLR) dans la NAFLD; d'après Roh et al., 2013⁶⁹

Un régime riche en graisse induit une translocation bactérienne soit en raison d'une pullulation des bactéries dans l'intestin, soit en raison d'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale.

Les PAMPs dont le LPS activent les cascades de signalisation associées aux TLRs. L'activation de TLR2,-4 et -9 dans les cellules de Kupffer induit la production de cytokines qui activent les cellules stellaires hépatiques et favorisent la stéatose et l'apoptose.

Les TLRs ont donc un rôle pivot dans la progression de la NAFLD et favorisent le développement de la fibrose, de la cirrhose et à terme de l'hépatocarcinome cellulaire.

Dans la NAFLD, on assiste à l'activation hépatique de l'inflammasome, complexe multiprotéique, en réponse à une stimulation par des produits particuliers : les DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) et les PAMPs issus de débris bactériens. L'activation de NLRP3 provoque la mort cellulaire et stimule la fibrogenèse⁷⁰.

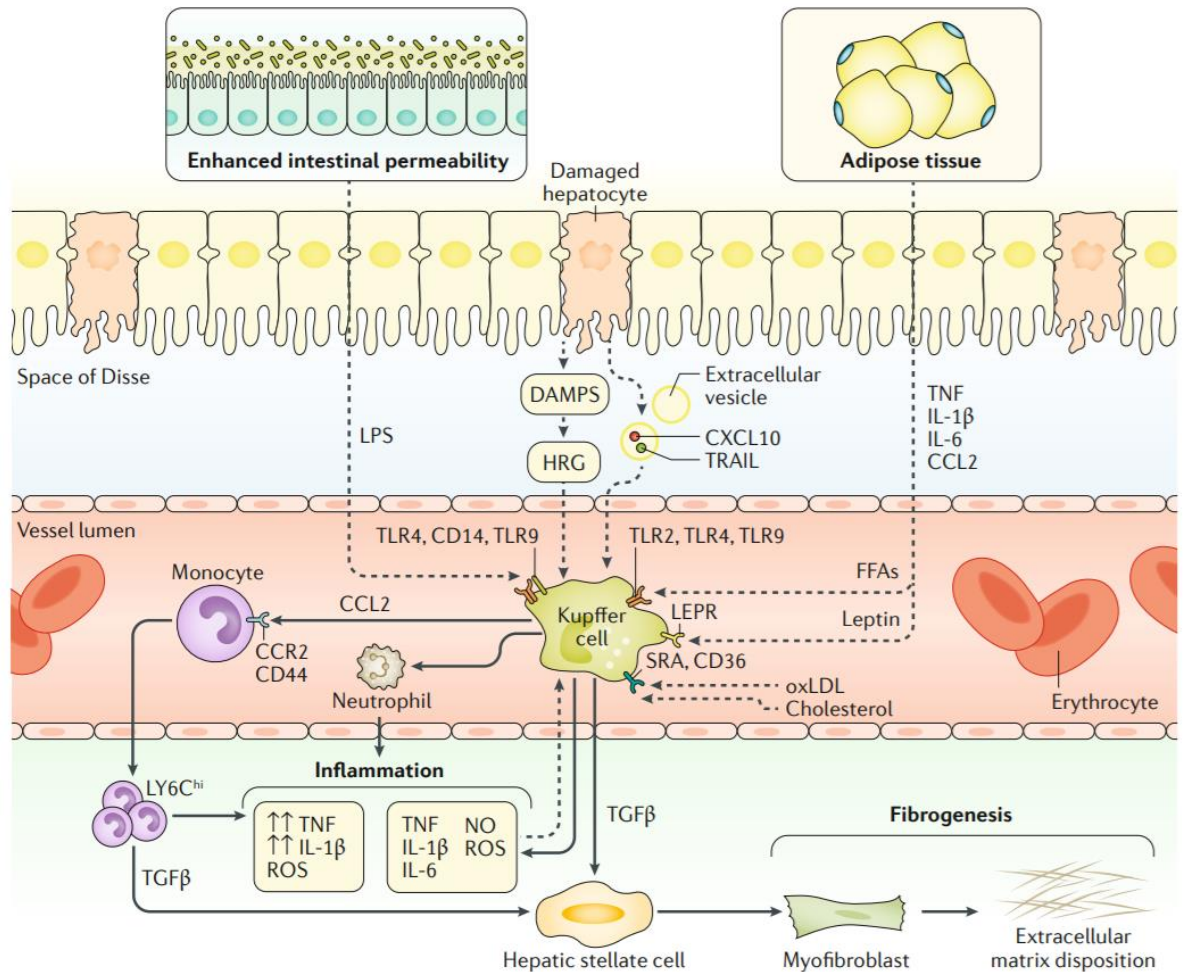


Figure 29: Activation des macrophages hépatiques dans la NASH; d'après Kazankov et al., 2019³⁹

Plusieurs voies permettent l'activation des cellules de Kupffer dans la NAFLD:

- Le LPS qui entre dans la circulation suite à une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et active les Toll-like receptors (TLRs),
- Certaines molécules caractéristiques comme les DAMPs;
- Les acides gras libres via les TLR et les adipokines comme la leptine issues du TA
- Le cholestérol et ses métabolites.
- Les cellules de Kupffer sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6 ce qui permet le recrutement de neutrophiles et des monocytes circulants.
- Les monocytes se différencient en macrophages pro-inflammatoires et amplifient l'inflammation hépatique. Cela contribue au développement de la fibrose après stimulation des cellules stellaires (HSCs). Les HSCs se transforment en myofibroblastes qui induisent le dépôt de matrice extracellulaire.
- CXL10, CXC-chemokine ligand 10; LY6C, lymphocyte antigen 6C; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; NO, nitric oxide; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; ROS, reactive oxygen species; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; DAMPs: damage associated molecular pattern; HRG: histidine-rich glycoprotein

2. Immunité innée et NAFLD

L'immunité innée joue un rôle majeur dans la pathogenèse de la NAFLD en favorisant l'inflammation systémique et le développement de la fibrose et implique une multitude de cellules : les cellules de Kupffer, les neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes Natural Killer T (NKT). Le foie confirme ici son rôle prépondérant en tant qu'organe immunitaire « like ». ⁴

Les cellules de Kupffer (CK) décrites précédemment sont des acteurs primordiaux de l'inflammation hépatique en réagissant à de multiples stimuli inflammatoires et en agissant à leur tour en tant que cellules sécrétrices de molécules pro-inflammatoires qui impactent les hépatocytes et induisent leur nécrose.

D'autres cellules de l'immunité innée sont recrutées lors de la NAFLD et participent également au développement de la pathologie même si leur rôle est moins clair ⁷¹.

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules immunes présentes en petite quantité dans le parenchyme hépatique. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes dont le rôle reste controversé dans la NAFLD. Les DC infiltrent le foie dans la NASH mais leur déplétion est corrélée à une exacerbation de la réponse inflammatoire. Les DC pourraient donc servir de régulateurs de la réponse inflammatoire par modulation de l'activation des CK ;

- Les lymphocytes natural killer T (NKT) sont des cellules immunes particulières localisées dans les sinusoides. Leur rôle dans la NASH n'est pas clair. Elles semblent déplétées au stade de stéatose puis réaugmentent avec la progression de la NAFLD vers la NASH et pourraient contribuer au développement de la fibrose,
- Les polynucléaires neutrophiles exacerbent quant à eux l'inflammation en participant au recrutement des macrophages et entraînent la libération de ROS et de myéloperoxydase qui induisent un dommage cellulaire. Leur accumulation est une des caractéristiques de la NASH.

Une autre facette de la réponse immunitaire rentre également en jeu dans la pathogenèse de la NAFLD : c'est la réponse immune adaptative. Cette réponse immune implique les lymphocytes T et B et joue un rôle dans la progression de la fibrose. Les lymphocytes CD4⁺ pourraient interagir directement avec les fibroblastes et les macrophages tandis que les lymphocytes CD8⁺ activent quant à eux les HSCs ^{4, 72}. Les lymphocytes B promeuvent la fibrose en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires IL4, IL-6 et IL-13 et ce indépendamment de leur activité sécrétrice d'anticorps.

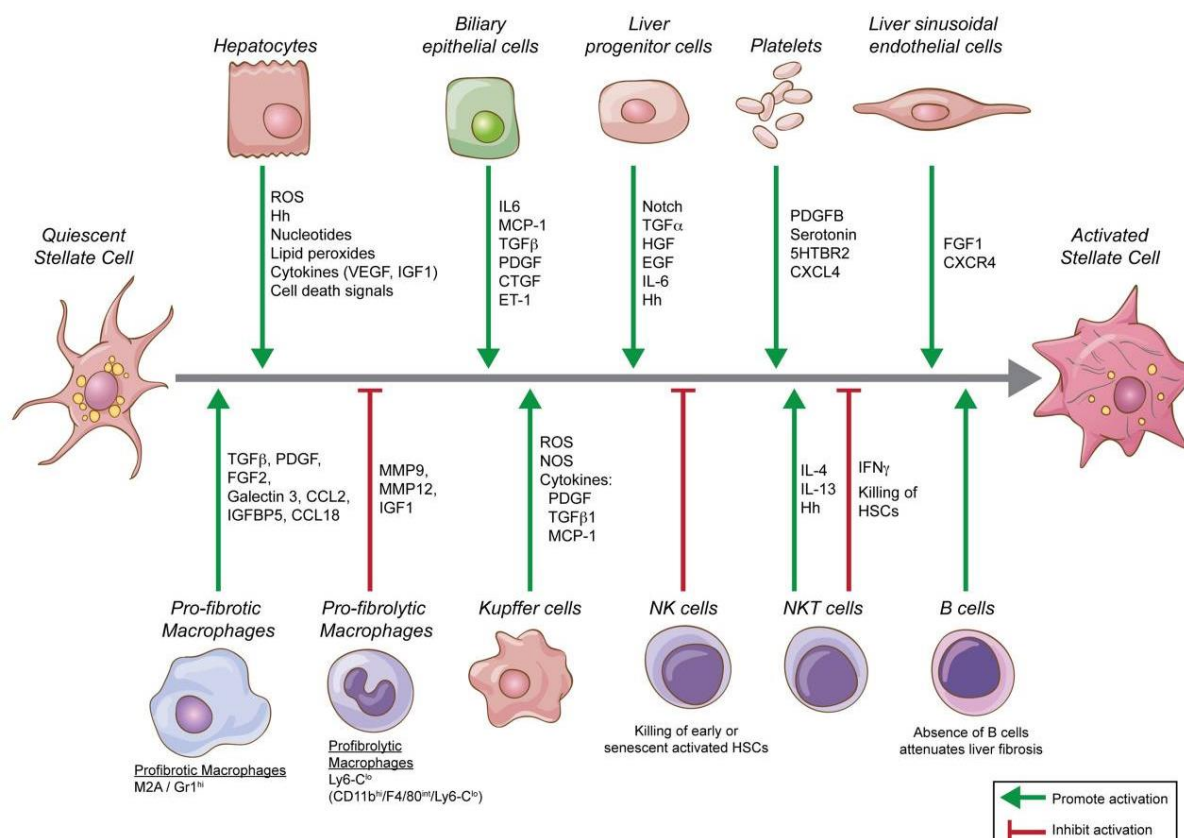


Figure 30: Cellules inflammatoires et immunitaires influant l'activation des cellules stellaires hépatiques; d'après Lee et al., 2015⁷²

Les cellules hépatiques participent à l'activation des cellules stellaires quiescentes soit en les activant (vert), soit en les inhibant (rouge).

Les lymphocytes T helper sont des acteurs essentiels de l'immunité adaptative dont le profil est soit Th1 pro-inflammatoire, soit Th2 pro-fibrogénique. L'analyse immunohistochimique d'échantillons de foie de patients NAFLD montre une prédominance des Th1. Cependant, les Th17 qui sécrètent une cytokine Il-17 et présentent des fonctionnalités Th1 et Th2 semblent jouer un rôle crucial dans le recrutement des neutrophiles et favorisent la réponse inflammatoire dans la NAFLD.

3. Progression vers la fibrose et développement de la NASH

La fibrogenèse hépatique correspond à l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) dans le foie en réponse à l'altération des hépatocytes. Les dommages hépatocytaires causés par la lipotoxicité, l'insulinorésistance, l'augmentation des corps apoptotiques, les ROS et l'inflammation via l'activation des cellules de Kupffer activent les cellules stellaires du foie⁴. Ces cellules, de manière réactionnelle, se transforment en myofibroblastes capables de produire des protéines matricielles contribuant à la formation d'un tissu cicatriciel⁷⁰. La

majeure partie des protéines de la MEC nouvellement formée est du collagène-1. Sa production est stimulée par le TGF β dont la signalisation est notamment induite par l'accumulation de lipides hépatiques. En temps normal, le foie est capable de se régénérer partiellement après une atteinte aiguë causant la mort des hépatocytes. Une atteinte chronique du foie à l'origine de taux continus et élevés d'hépatocytes mourants conduit au contraire à une réparation tissulaire qualifiée de « futile »⁷³. Le parenchyme hépatique est progressivement remplacé par des cicatrices tissulaires et contient un nombre important de progéniteurs hépatocytaires immatures pour remplacer les hépatocytes morts⁷⁴. Le foie est dans un état fibrotique qui évolue progressivement vers la cirrhose et favorise le développement d'un hépatocarcinome cellulaire.

D. Susceptibilité individuelle dans la NAFLD : rôle du polymorphisme génétique

1. Polymorphisme génétique

Comme de nombreuses pathologies, la NAFLD présente une composante génétique pouvant expliquer la susceptibilité individuelle relative au risque de développement de la maladie. Une étude d'association pangénomique réalisée en 2015 par l'équipe de Macaluso a démontré qu'au moins une douzaine de gènes était potentiellement impliquée dans la NAFLD⁷⁵. Les gènes impliqués dans la pathologie peuvent être classés en 7 catégories selon leur implication mécanistique :

- Oxydation et transport des lipides hépatiques lors de la stéatose (PNPLA3, TM6SF2, NR1H2, PPAR α , PEMT, MTP, APOC3, APOE),
- Métabolisme du glucose et insulino-résistance (ENPP1/IRS1, GSKR, SLC2A1, GOAT, TCF7L2, PPAR γ),
- Import ou synthèse de lipides dans la stéatose (SLC27A5, FADS1, LPIN1),
- Stress oxydant dans la stéatohépatite (HFE, GCLC/GCLM, ABCC2, SOD2),
- Réponse aux endotoxines dans la stéatohépatite (TLR4, CD14),
- Cytokines (TNF, IL6),
- Fibrose (AGTR1, KLF6).

Le polymorphisme le plus étudié est celui de PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3), qui pourrait jouer un rôle dans le remodelage des gouttelettes lipidiques dans le foie et participer à l'export des VLDL¹⁷. Le variant rs738409 de PNPLA3 est associé au développement de la stéatose hépatique, à la progression de la fibrose et au développement

de la stéatohépatite ^{37, 73}. La présence de cette mutation génique triple le risque d'augmenter le score nécro-inflammatoire et de développer une fibrose ¹⁷.

L'autre acteur génique majeur étiqueté dans la NAFLD est le TM6SF2 (Transmembrane 6 superfamily 2). TM6SF2 encode une protéine régulant le contenu lipidique hépatique, favorisant la sécrétion hépatocytaire des VLDL. Un variant génique de TM6SF2 (s58542926) est associé avec le développement de la NAFLD et sa présence est corrélée avec des taux plus élevés de transaminases plasmatiques et avec une diminution de la concentration sanguine en TG et en LDL ⁶². Si plusieurs gènes peuvent intervenir dans la NAFLD/NASH, PNPLA3 et TM6SF2 ont été identifiés sur plusieurs populations distinctes géographiquement et présentent donc une pertinence clinique plus importante.

D'autres gènes d'intérêt émergent régulièrement dans la littérature avec les avancées scientifiques autour de la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD. La famille de gènes FAM3 et trois de ses membres (FAM3a, -b, et -c) ont récemment été étiquetés comme d'importants régulateurs du métabolisme du glucose et des lipides et leur expression semble altérée chez les patients NAFLD et NASH ⁷⁶.

Le FNDC5 (fibronectin type III domain-containing 5) permettant par clivage protéolytique de générer de l'irisine est également considéré comme un facteur protecteur dans la NAFLD ⁷⁷. L'irisine est une myokine impliquée dans la thermogénèse du tissu adipeux et dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. Chez les patients obèses, un polymorphisme spécifique de FNDC5 a été mis en évidence. La présence de l'allèle minoritaire de FNDC5 (rs3480) entraînerait une diminution de la stabilité du gène ne permettant plus d'activer les voies de signalisation irisine-FNDC5 et favorisant alors le développement de la stéatose hépatique ⁷⁸.

2. Microbiote intestinal

Si les modifications alimentaires des dernières années et la sédentarisation du mode de vie ont favorisé le développement des pathologies métaboliques, une susceptibilité individuelle découlant de modifications du microbiote intestinal est incriminée dans la pathogenèse de la NAFLD ⁷⁰. Le rôle du microbiote intestinal dans la pathogenèse de la NAFLD sera détaillé plus loin dans le manuscrit .

Chapitre 3 : Implications des tissus adipeux dans la NAFLD

Le tissu adipeux blanc (TA) est un acteur majeur de la pathogenèse de la NAFLD/NASH. Le TA est constitué de cellules spécialisées dans la prise en charge des AGs, formant de larges dépôts localisés dans divers endroits de l'organisme. Deux dépôts revêtent un intérêt particulier : le TA viscéral et le TA sous-cutané. Le TA viscéral, de par sa proximité anatomique avec le foie entretient une relation métabolique spécial avec ce dernier. Ainsi, les facteurs de régulation et les métabolites relargués par les adipocytes du TA interagissent avec les cellules hépatiques et peuvent contribuer au développement de la NAFLD et de la NASH. Le TA est ainsi impliqué dans l'IR et peut être le siège d'une inflammation locale dont les répercussions vont affecter le fonctionnement hépatique et contribuer à l'évolution de la pathologie ⁷⁹.

I. Inflammation du tissu adipeux blanc

L'altération des processus de stockage de l'énergie dans la NAFLD, s'accompagne de l'installation d'une inflammation chronique de bas grade au sein du tissu adipeux ³⁸. Cette inflammation entraîne la sécrétion d'IL-6 et de TNF α , cytokines pro-inflammatoires. Le TNF α induit une insulino-résistance adipocytaire en impactant la phosphorylation d'IRS1. Dans le tissu adipeux on assiste à une infiltration macrophagique et à l'activation des macrophages résidents. Ces macrophages sont de plus polarisés soit M1 soit M2 et ont les mêmes propriétés réactives et sécrétrices que les cellules de Kupffer ³⁸. Comme dans le foie, le ratio M1/M2 est augmenté et les macrophages pro-inflammatoires exercent leur activité via libération de médiateurs de l'inflammation. Le tissu adipeux possède une grande capacité de sécrétion de cytokines et le taux d'IL1 β ou d'IL-6 dans ce tissu est 10 fois supérieur à celui du foie⁸⁰. IL-6 stimule l'activation de la voie de signalisation JNK-1 qui contribue à l'atteinte hépatique notamment en diminuant la sensibilité à l'insuline des hépatocytes et en favorisant la stéatose^{4, 39}. Le tissu adipeux est de plus doté de lymphocytes T dont la composition varie en fonction de la progression de la pathologie. Ainsi, avec l'aggravation de la maladie, on assiste à une augmentation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et à une diminution de la population de lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces changements précèdent et influencent l'infiltration macrophagique tissulaire ³⁸. Il existe donc un lien fort entre le tissu adipeux et le foie dans la pathogenèse et la progression de la NAFLD en NASH. Une augmentation

plasmatique des concentrations en cytokines pro-inflammatoires issues du tissu adipeux entretient et amplifie l'inflammation hépatique ³⁶.

Comme énoncé précédemment, le tissu adipeux est capable de sécréter des médiateurs spécifiques, les adipokines. Parmi les adipokines les plus importantes on retrouve la leptine et l'adiponectine. Ces adipokines interagissent avec les macrophages et les HSCs et contribuent au développement de la pathologie.

La leptine interagit avec son récepteur LEPR au niveau hypothalamique pour supprimer la sensation de faim et favoriser l'utilisation énergétique. L'activation du récepteur induit une cascade de réactions impliquant de nombreuses voies de signalisation dont SHP-2 et STAT3 qui régulent l'activation de ERK et PI3K ³⁸. Dans la NASH, les taux de leptine sont élevés et corrélés à la sévérité de la pathologie. Si la leptine semble avoir des effets anti-stéatotiques et réprimer la DNL, elle favorise également le développement de la fibrose et de l'inflammation hépatique dans la NAFLD ³⁹.

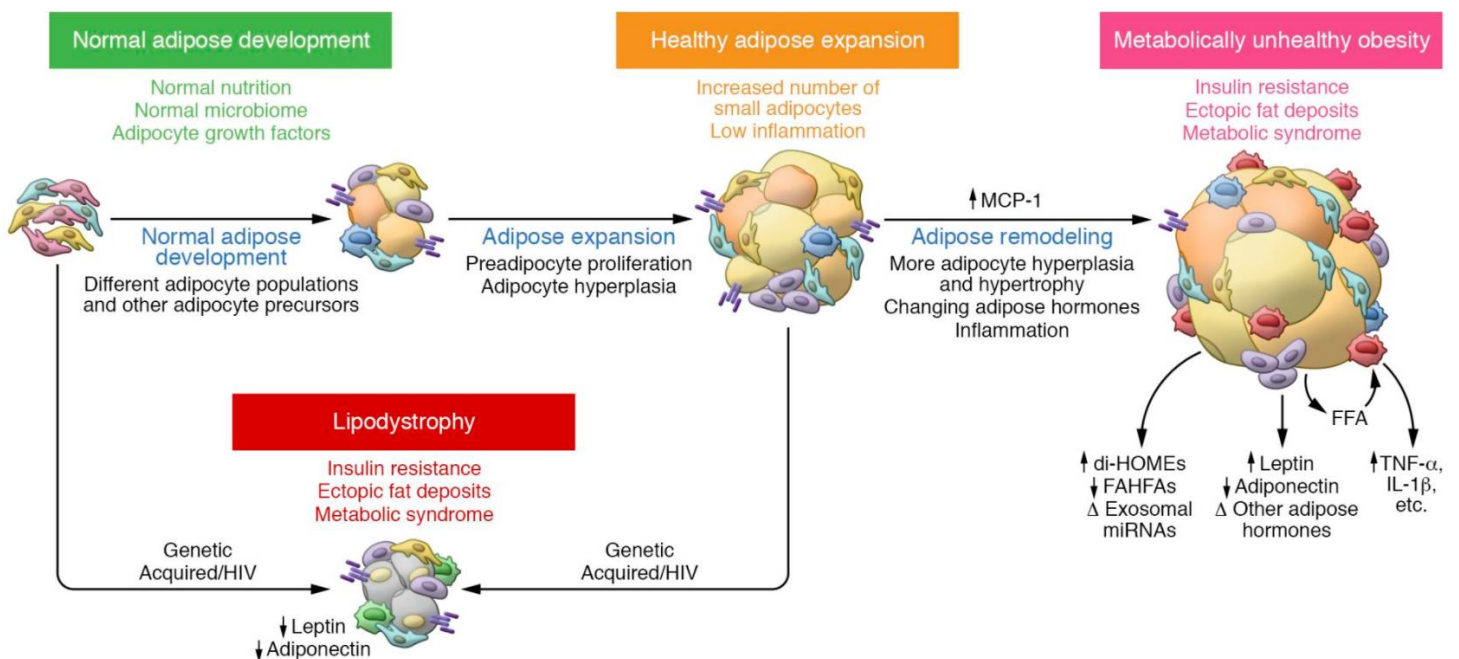


Figure 31: Modelage du tissu adipeux; d'après Kahn et al., 2019 ³⁸

De gauche à droite, cette figure illustre la conversion des pré-adipocytes en adipocytes matures puis l'expansion du WAT avec prolifération adipocytaire et hyperplasie des adipocytes. En conditions pathologiques, on assiste à une hypertrophie des adipocytes qui perdent leur sensibilité à l'insuline. Le WAT est infiltré par des macrophages qui instaurent une inflammation de bas grade

L'adiponectine semble à l'inverse réduite chez les patients NAFLD et son expression est corrélée négativement au taux de masse grasse corporelle. L'adiponectine joue un rôle dans la préservation de la sensibilité à l'insuline via activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) suite à la fixation sur ses récepteurs (adipoR1 et adipoR2). L'activation de l'AMPK

stimule PPAR α et favorise l'oxydation mitochondriale des acides gras ce qui diminue par conséquence la stéatose hépatique³⁹. Enfin l'adiponectine interagit avec les HSCs et supprime leur prolifération et leur migration réduisant ainsi l'inflammation hépatique.

D'autres adipokines comme la résistine sont également libérées par les tissus adipeux et exercent leur rôle dans l'homéostasie métabolique.

Dans le tissu adipeux, le syndrome métabolique induit par ailleurs un état fibrotique avec un remodelage anormal de la matrice extracellulaire, accumulation de collagène et diminution des quantités d'élastine. Le tissu adipeux perd alors son élasticité et les adipocytes ne sont plus en mesure d'exercer pleinement leur activité métabolique. Un des effets de cette fibrose adipocytaire est l'impact sur le stockage des AG. Le tissu adipeux ne pouvant plus s'expandre, cela favorise les dépôts ectopiques de lipides dans les organes périphériques⁴¹.

II. Tissu adipeux brun et brunissement du TA

Inversement à l'inflammation, le brunissement du TA est un facteur améliorant le syndrome métabolique. Ce brunissement du TA est lié au fait que la morphologie des adipocytes et l'expression des gènes acquièrent un profil semblable à celui des adipocytes bruns.

A. Tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun (BAT) est un tissu adipeux dont les dépôts sont extrêmement réduits chez l'homme adulte par rapport aux dépôts de tissu adipeux blanc⁷⁹. Le BAT est majoritairement localisé dans les régions cervicale, supra-claviculaire, paravertébrale et péri-rénale chez l'homme tandis qu'on le retrouve essentiellement au niveau interscapulaire chez le rongeur⁸¹. Cette localisation stratégique est liée à sa fonction thermogénique, permettant le réchauffement de vaisseaux sanguins irriguant des organes essentiels. Il est principalement présent chez le nouveau-né, en particulier chez les grands mammifères y compris l'homme.

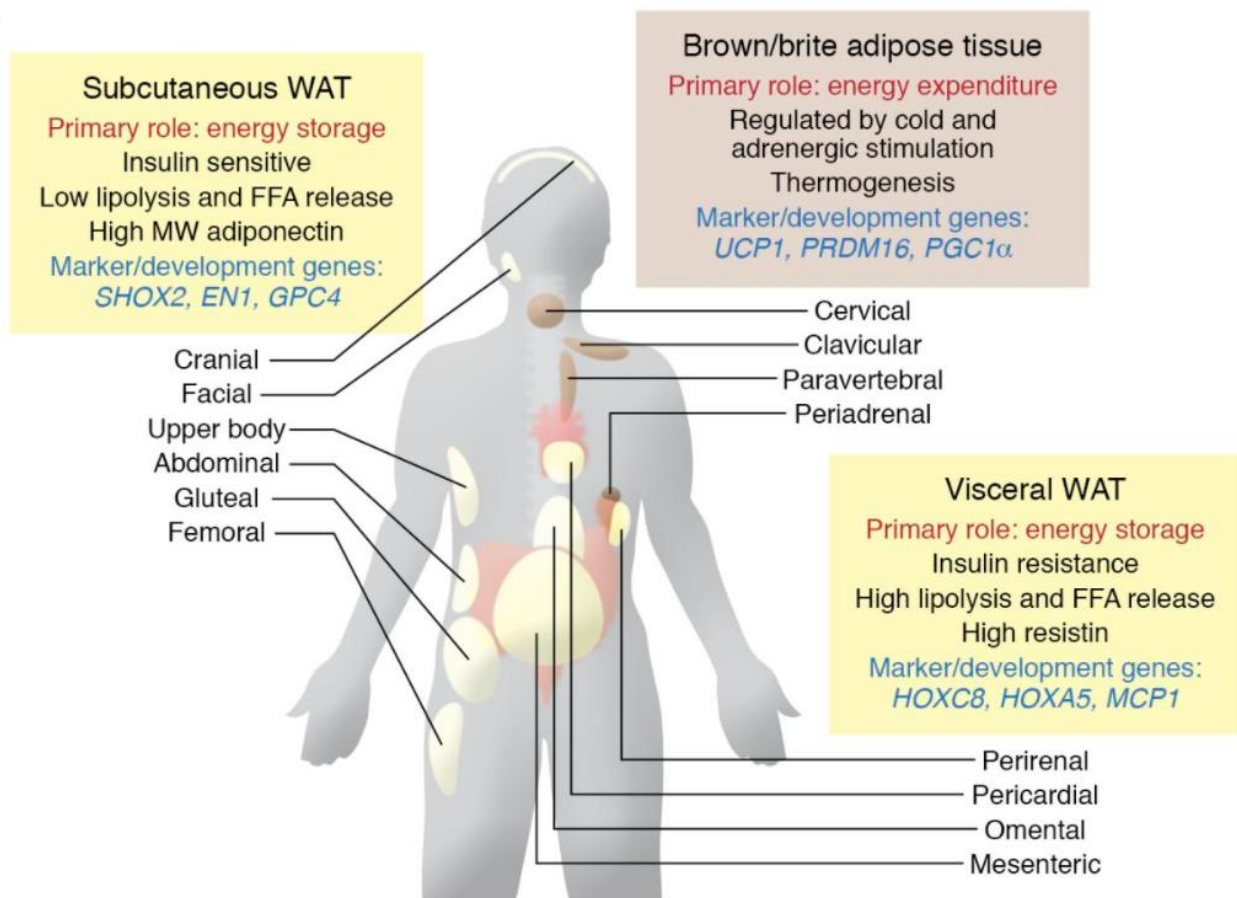


Figure 32: Hétérogénéité des tissus adipeux chez l'Homme; d'après Kahn et al., 2019³⁸

Le tissu adipeux blanc est majoritairement localisé au niveau viscéral et sous-cutané. Sa fonction principale est le stockage d'énergie puis chacun des dépôts présente des fonctions spécifiques décrites dans la figure. Des dépôts de tissu adipeux brun sont présents en petite quantité et assurent une thermogénèse sans frisson avec dépense énergétique.

1. Morphologie du BAT

Comme le TA, le BAT est constitué d'adipocytes mais leurs morphologies propres sont différentes.

L'adipocyte blanc est une cellule ronde large de 25 à 200 μm qui contient une gouttelette lipidique uniloculaire entourée d'une fine couche de cytoplasme avec quelques mitochondries et un noyau plat localisé à la périphérie de la cellule.

L'adipocyte brun présente quant à lui un cytoplasme comprenant plusieurs gouttelettes lipidiques multiloculaires et une quantité importante de mitochondries. Les mitochondries du tissu adipeux brun expriment dans leur membrane interne une protéine spécifique : UCP1 (Mitochondrial Uncoupling Protein) responsable de la fonction thermogénique qui permet d'ailleurs l'identification des dépôts de BAT^{82, 83 84}. L'expression de certains gènes est

également plus importante dans le BAT par rapport au TA comme Cidea, qui pourrait favoriser l'oxydation des AGs et influencer ainsi sur le métabolisme des lipides. Le BAT est de plus extrêmement vascularisé et innervé.

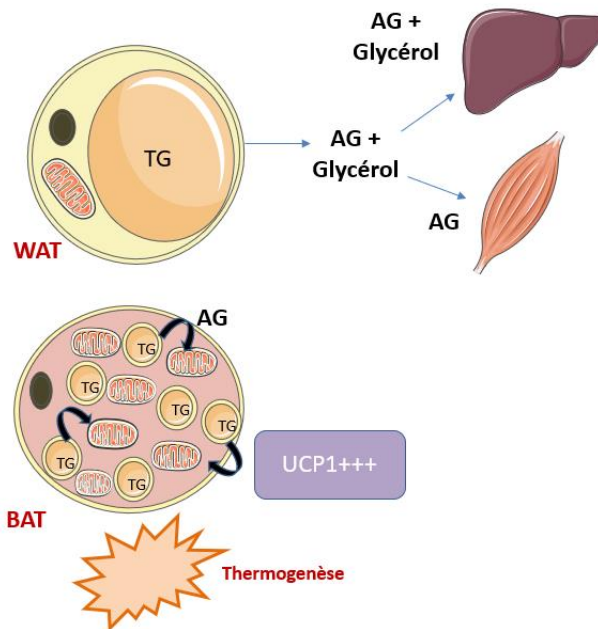


Figure 33: Structure du tissu adipeux brun et du tissu adipeux blanc; d'après Nishimoto et al. 2017⁸⁴
Les adipocytes du WAT contiennent une large vacuole lipidique. Le WAT stocke les AG sous forme de TG et les libère si besoin dans la circulation sanguine. Les AGs vont alors rejoindre le foie et le muscle squelettique. Le BAT est doté de nombreuses gouttelettes lipidiques et est riche en mitochondries. Il exprime par ailleurs UCP1. L'activation du BAT entraîne l'oxydation des AGs par les mitochondries et permet la production de chaleur plutôt que d'ATP.

2. Fonctions du BAT

La fonction principale du BAT est la thermogénèse sans frisson. Lors d'une exposition au froid, des acides gras libres issus de la lipolyse sont métabolisés. Les coenzymes obtenus vont alimenter la chaîne respiratoire qui produit normalement de l'ATP mais qui dans l'adipocyte brun induit la production de chaleur grâce au découplage mitochondrial assuré par UCP-1. Cette transformation des lipides en énergie thermique s'accompagne d'une augmentation du métabolisme de l'hôte. L'activation du BAT par le froid est appelée CIT (cold-induced thermogenesis)⁸⁵. Le BAT activé induit une augmentation de la dépense énergétique qui s'accompagne donc d'un contrôle du poids corporel. Il est estimé que l'activation complète du BAT pourrait contribuer à 5% du métabolisme basal⁸⁶. De nombreuses études ont montré que l'activation du BAT améliorerait la perte de poids via la thermogénèse et l'augmentation de la dépense énergétique. En effet, le taux de BAT et son activité semblent être plus élevés chez

les populations minces que chez les obèses ce qui renforce l'idée de l'implication de ce tissu dans le contrôle du poids.

Au cours des dernières années, l'activation du BAT s'est révélée une piste d'intérêt dans le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique et dans la régulation des facteurs de risques cardiovasculaires. Une étude a notamment montré que l'un des substrats utilisés par le BAT était les acides gras issus des triglycérides intracellulaires permettant ainsi une diminution du stockage des TG au niveau organique⁸⁷. Des études menées chez la souris ont prouvé que la délétion du gène codant pour l'UCP1 induisait une prise de poids chez ces souris dans des conditions thermiques neutres en l'absence d'un stress extérieur^{88, 89}. De même, il a été montré que la présence et l'activation d'UCP1 dans le BAT protégeait du développement de l'obésité⁹⁰. Enfin, le traitement de rongeurs par des agonistes des récepteurs β -adrénergiques, permettait de diminuer l'obésité ; ces composés activant pharmacologiquement la thermogénèse^{91,92}. Le taux de BAT activé présent dans les tissus animaux semble être corrélé positivement à une prévention de l'obésité et du syndrome métabolique. Inversement, un BAT peu actif est associé à des phénotypes d'obésité et de diabète de type II^{89, 93-95}.

Le BAT activé influe sur le métabolisme du glucose en potentialisant son absorption ce qui permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de maîtriser les concentrations sanguines en glucose. L'exposition de patients obèses ou en surpoids au froid permettant l'activation du BAT a montré une amélioration de 43% de l'insulinorésistance s'accompagnant d'une augmentation de l'oxydation des AGs⁸⁵. De plus, l'équipe de Stanford a entrepris une transplantation de tissu adipeux brun au niveau viscéral chez des souris induisant une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les receveuses. Cette amélioration du métabolisme glucidique s'accompagnait d'une perte de poids, d'une diminution de la masse grasse et d'une réversion complète de l'insulino-résistance induite par un régime enrichi en graisses⁹⁶. De nombreuses études ont ainsi prouvé qu'une augmentation de la masse du BAT et de son activité pouvait permettre de prévenir le développement de la NAFLD. Chez l'homme les résultats restent contrastés et aucun changement sur le poids global n'a été induit par l'activation du BAT. Certaines études démontrent tout de même que chez les individus présentant un BAT activé, la prévalence de la NAFLD est atténuée et les taux de transaminases normalisés contrairement aux patients pour lesquels aucune activité du BAT n'est détectée⁷⁹.

Il semble donc que le BAT ait un potentiel métabolique fort. L'activation du BAT est principalement sous le contrôle des agonistes β -adrénergiques et les effets secondaires sur le cœur restent à ce jour un frein pour une activation de ce type. L'activation du BAT est également liée à la composition du microbiote intestinal et nous y reviendrons ultérieurement (Chapitre 6 ; III).

En revanche, un grand nombre d'études ont désormais démontré que le tissu adipeux blanc peut abriter en son sein des adipocytes dont les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles se rapprochent de celles d'un adipocyte brun.

3. Brunissement du tissu adipeux blanc

Outre les adipocytes du TA et du BAT, des adipocytes intermédiaires existent et possèdent une signature propre, intermédiaire entre un adipocyte brun fonctionnel et un adipocyte blanc. Ils sont qualifiés d'adipocytes « beiges » ou brunissant. Ces adipocytes présentent non plus une vacuole lipidique unique mais un aspect multiloculaire typique d'un adipocyte brun et voient leur contenu en mitochondries augmenté.

Depuis quelques années des études chez le rongeur ont mis en évidence l'apparition d'adipocytes beiges UCP1+ au sein du tissu adipeux blanc. S'ils présentent de l'UCP1, cette expression reste faible comparée à celle observée dans les adipocytes bruns. Le phénomène de brunissement du TA a été proposé comme étant impliqué dans la protection contre l'obésité induite par un régime riche en graisses⁸⁵. A l'instar des adipocytes bruns, les adipocytes beiges sont donc capables d'initier une transformation énergétique thermogénique sous l'action de divers stimuli comme le froid, des composés chimiques ou des facteurs endocrines. Ce processus est réversible et témoigne de la grande plasticité de ces adipocytes face aux conditions extérieures⁹⁷⁻⁹⁹. Néanmoins, la quantité d'adipocytes beiges au sein du TA et leur fonction intermédiaire ne permet pas de transformer un dépôt de TA en dépôt de BAT.

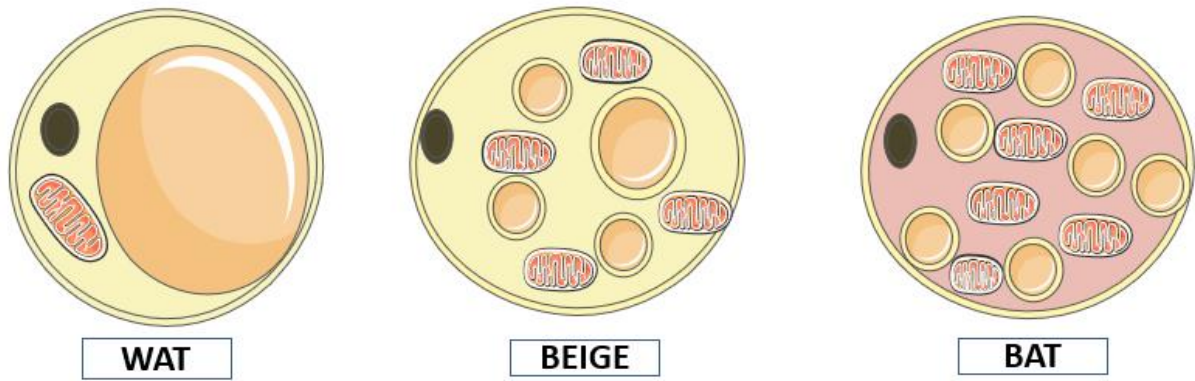


Figure 34: Différences morphologiques entre les tissus adipeux blanc, beige et brun; d'après Kwok et al., 2016⁹⁹
(coupes de tissus adipeux en coloration hématoxyline/éosine à grossissement x40)

Les facteurs connus capables d'influer sur le brunissement du TA sont le froid et une stimulation β -adrénergique. D'autres interlocuteurs apparaissent dont l'irisine, le FGF21 (fibroblast growth factor 21), l'acide β -aminobutyrique, les agonistes de PPAR γ , la leptine et les acides biliaires^{41, 100}. Dans la lutte contre l'obésité, une attention particulière a été apportée à l'irisine, myokine induite lors de l'exercice physique et susceptible d'induire le brunissement du tissu adipeux. Le mécanisme aboutissant à ce brunissement des adipocytes reste cependant en grande partie incompris.

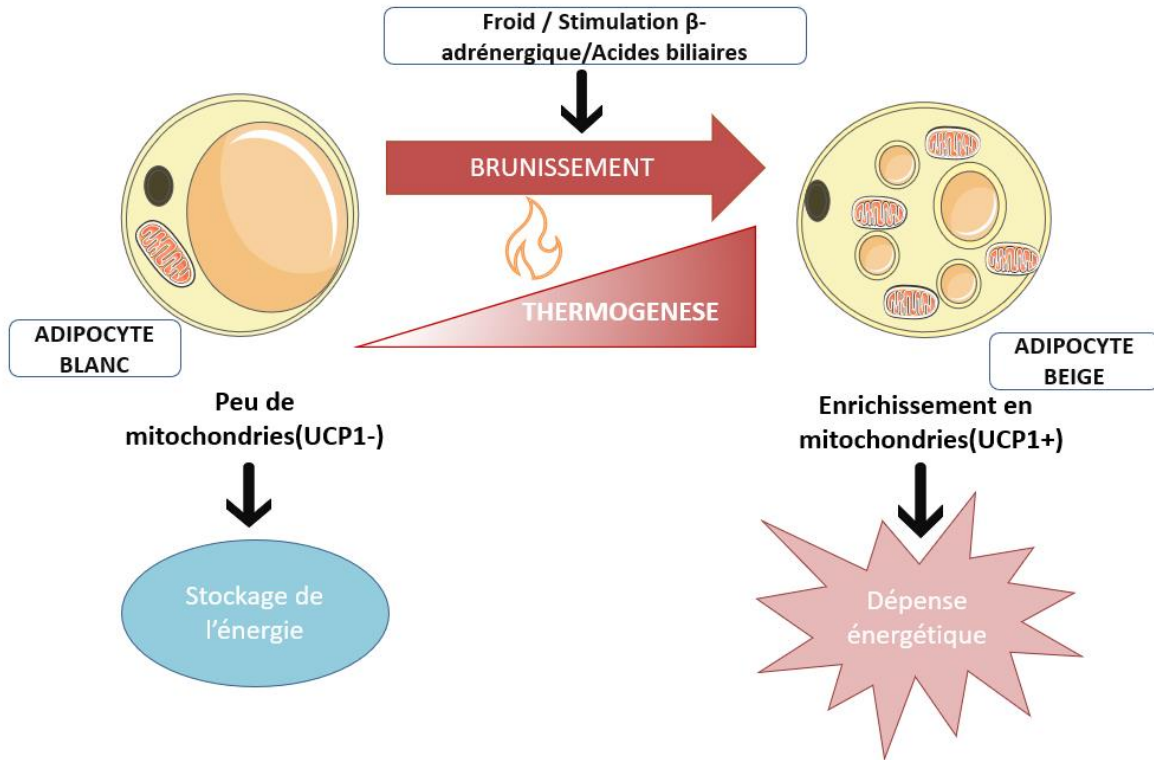


Figure 35: Brunissement du tissu adipeux, d'après Lee et al., 2019 ¹⁰⁰

Chapitre 4 : LE MICROBIOTE INTESTINAL

I. Généralités

Le microbiote intestinal (MI) a d'abord été défini comme l'ensemble des micro-organismes (virus, bactéries, champignons, archées) contenu dans le tractus intestinal¹⁰¹. Néanmoins, ces dernières années le consensus général tend à utiliser ce terme uniquement pour parler des espèces bactériennes digestives, les termes de mycobiote et virome étant respectivement utilisés pour parler des champignons (levures) et des virus. Le MI constitue un écosystème complexe et extrêmement varié. On estime que l'intestin héberge 10^{14} bactéries appartenant à près de 1500 espèces différentes exprimant au total plus de 3 millions de gènes.¹⁰²⁻¹⁰⁸.

La distribution bactérienne temporelle et spatiale varie en fonction des segments de l'intestin et suit un gradient oro-anal, l'estomac contenant peu de bactéries (10^4 UFC/g de contenu) tandis que le côlon concentre une population importante de micro-organismes (environ 10^{11} UFC/g de contenu). De nombreux facteurs liés au micro-environnement intestinal influencent le contenu bactérien dans le tube digestif, tels que le pH et la teneur en oxygène. Ainsi, les segments hauts du tube digestif plus oxygénés et plus acides favoriseront le développement et l'implantation de bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives. Le côlon quant à lui présente un environnement basique peu oxygéné ce qui en fait un milieu propice au développement des bactéries anaérobies facultatives et strictes¹⁰⁹. Une grande majorité des bactéries du MI reste difficile à étudier par des méthodes de cultures classiques du fait de leurs conditions de vie exigeantes. L'optimisation des biotechnologies au cours des dernières années a été moteur dans les avancées scientifiques liées au décryptage du microbiote et à la compréhension des mécanismes qui lui sont liés.

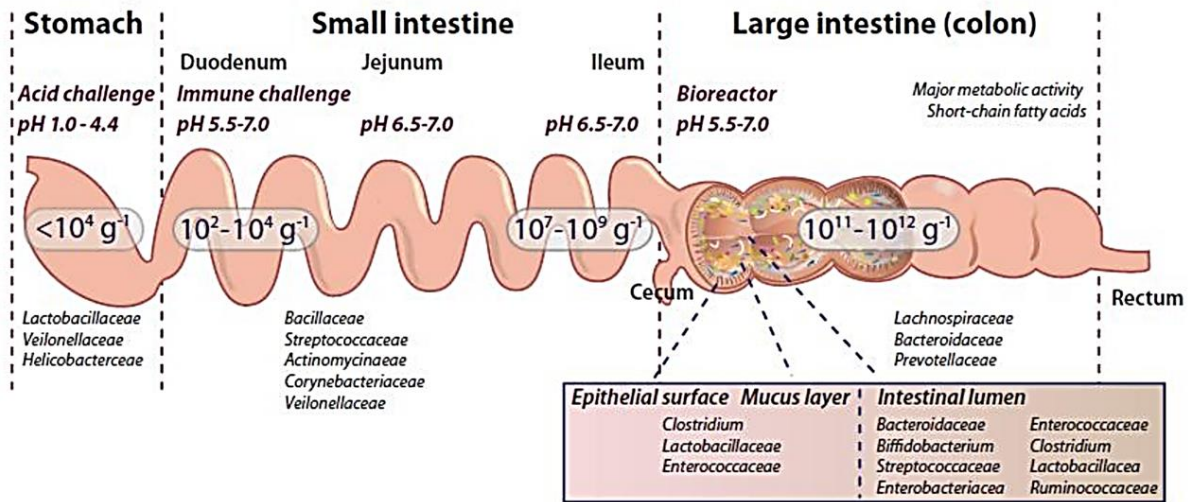


Figure 36: Répartition spatiale du MI chez l'Homme; d'après Kovatcheva-Datchary, 2015¹³⁴.

La répartition et la nature des espèces bactériennes varient le long de l'appareil digestif en fonction du pH du milieu et de la disponibilité en oxygène.

Les bactéries répondent à une classification taxonomique précise à plusieurs niveaux. L'ensemble des bactéries constitue un règne au sein duquel on distingue des catégories annexes regroupant des bactéries similaires au même titre qu'un arbre phylogénétique. Le plus grand des embranchements est celui des phyla. Chez l'homme les deux phyla majoritaires sont les Firmicutes (60 à 80% des bactéries identifiées) et les Bacteroidetes (20% des bactéries identifiées)¹⁰⁵. Viennent ensuite des phylas minoritaires : Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, TM7 et Cyanobacteria¹¹⁰.

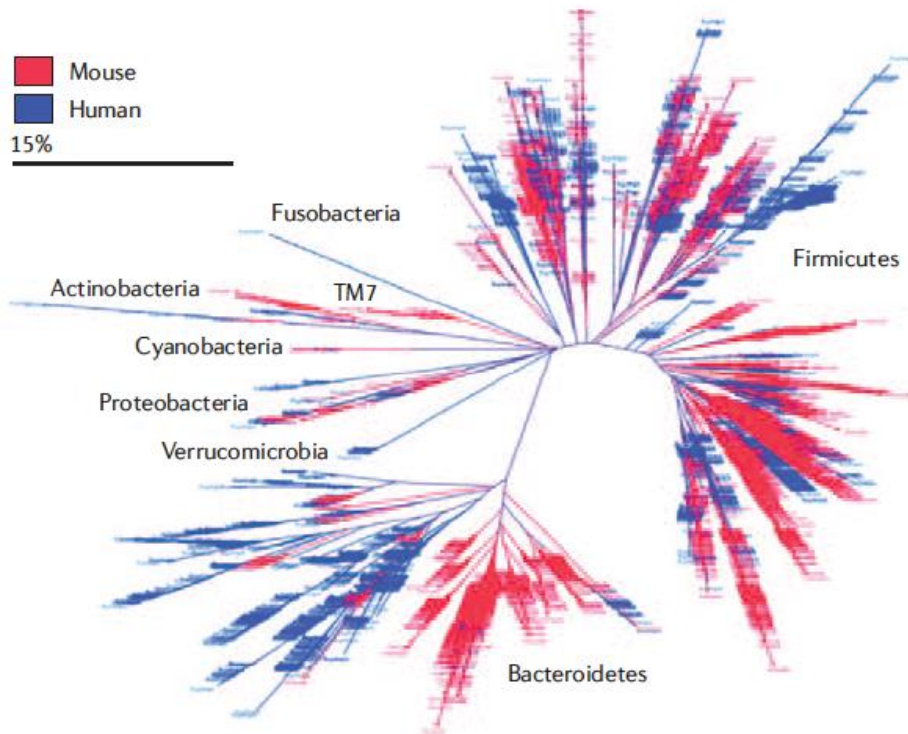


Figure 37: Arbre phylogénétique représentant les groupes dominants du microbiote intestinal chez l'homme et dans le modèle murin; d'après Spor et al., 2011 ¹¹⁰

Au sein d'un phylum le groupe de bactéries se scinde en classes, puis en ordres et en familles. Les familles regroupent des genres bactériens et ces genres se divisent en espèces bactériennes spécifiques. Au sein même de l'espèce, on peut retrouver un grand nombre de souches dont l'identification peut être cruciale, certaines souches pouvant s'avérer pathogènes, la plus médiatisée étant *Escherichia coli*.

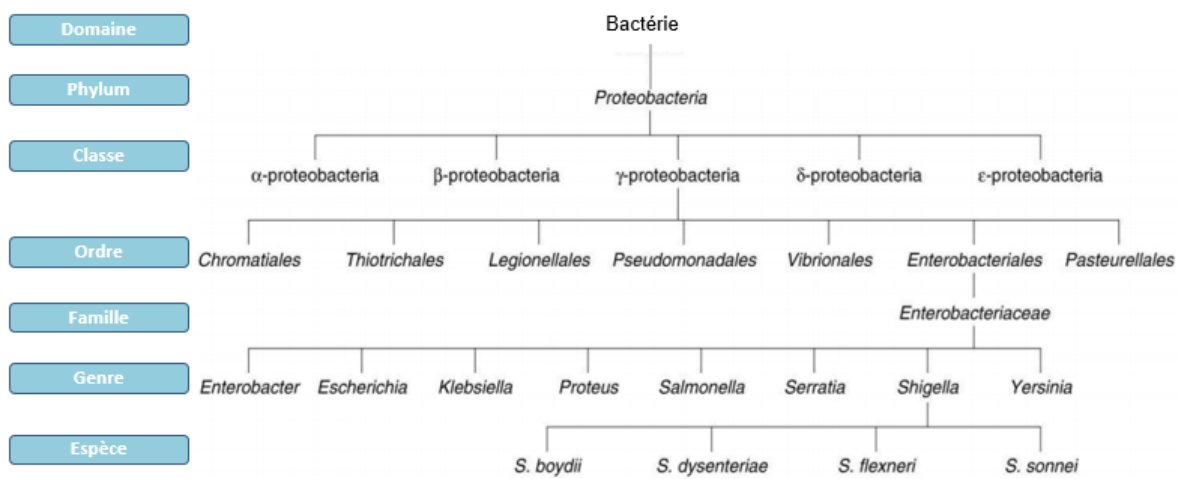


Figure 38: Taxonomie bactérienne. Exemple des Proteobacteria

II. Fonctions du MI

A. Fonctions métaboliques du MI

Le microbiote intestinal est depuis quelques années perçu comme un nouvel organe, participant activement au fonctionnement de l'organisme. Le MI évolue en symbiose avec l'hôte et contribue au maintien des grandes fonctions du corps humain. Les bactéries trouvent leurs sources de nutriments dans les débris cellulaires et les substrats issus de l'alimentation. Les bactéries qui possèdent des activités métaboliques sont donc capables de transformer les nutriments de l'alimentation en métabolites variés qui, à la suite de réactions spécifiques, serviront de substrats à la formation de divers composés qui peuvent s'avérer toxiques pour l'organisme. Parmi les dérivés générés on retrouve les acides gras à chaîne courte (SCFAs), mais également du tryptophane, des indoles dont certains sont des ligands du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). En plus de son implication dans le métabolisme des SCFAs et des acides biliaires ainsi que son rôle dans l'immunité, le MI participe également à la synthèse vitaminique dont notamment la vitamine K, essentielle à l'organisme, la vitamine B12 et la vitamine B8 ¹¹¹.

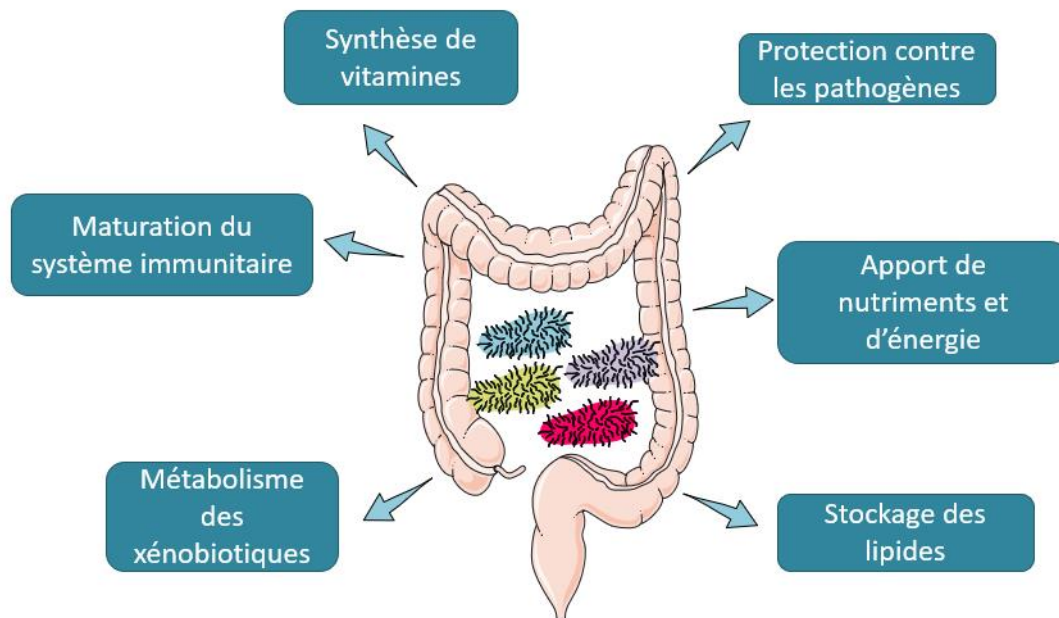


Figure 39: Fonctions du microbiote intestinal

L'hôte et le microbiote intestinal agissent en symbiose chacun participant au bien-être de l'autre. Le MI joue un rôle dans l'immunité, dans la synthèse protéique et participe à l'homéostasie métabolique de l'hôte.

B. Fonction immunitaire

Le MI se révèle un acteur majeur dans le bon fonctionnement immunitaire de l'organisme. Indépendamment de son rôle dans la maturation du système immunitaire et de sa régulation, le MI a pour première fonction de s'opposer à la colonisation intestinale d'espèces pathogènes extérieures ou de bactéries endogènes potentiellement pathogènes (pathobiontes). D'autre part le MI permet la maturation du système immunitaire. Ainsi, chez les souris axéniques dont le système immunitaire est défaillant, l'implantation d'un microbiote intestinal permet de restaurer une fonction immunitaire adéquate ^{112, 113}.

Les études les plus récentes prouvent également que la séquence d'acquisition des différentes espèces bactériennes est cruciale pour la maturation de ce système immunitaire. La stimulation permanente du système immunitaire par le MI permet son bon fonctionnement et régule notamment les réponses inflammatoires ^{114 113}. C'est ce maintien de l'homéostasie immunitaire qui permet également de maintenir le MI à distance. En effet, la production d'IgA au niveau intestinal dirigées contre le MI est un paramètre essentiel pour permettre l'élimination quotidienne des bactéries intestinales. ¹¹⁵

Le MI contribue au maintien de l'imperméabilité intestinale, paramètre majeur de l'effet barrière de l'épithélium intestinal, protégeant le tractus digestif des agressions extérieures. Les produits issus du métabolisme bactérien comme les SCFAs contribuent au maintien d'une barrière fonctionnelle en agissant sur les jonctions serrées épithéliales ^{116, 117}.

III. Modifications du MI

Le microbiote intestinal est donc le siège d'une production complexe et extrêmement dynamique de métabolites qui participent au maintien des fonctions primaires de l'organisme et qui dépendent directement de la composition du MI.

La composition du MI varie entre les individus et tout au long de la vie. On estime que le premier contact, qui se produit à la naissance, joue un rôle dans la détermination du MI de l'hôte, et que la méthode d'accouchement (voie basse versus césarienne) expose déjà à un MI différent ^{118, 119}. Le MI évolue durant les 3 premières années de la vie puis se stabilise jusqu'à l'âge adulte ¹²⁰.

La composition qualitative et quantitative des espèces bactériennes constituant le MI d'un individu est sous contrôle de différents facteurs environnementaux et intrinsèques. Ainsi, l'âge, la localisation géographique, l'activité physique, les médicaments et le régime alimentaire apparaissent comme les grands modulateurs du MI ¹²¹. Ces facteurs influençant la composition du MI le rendent soit très protecteur pour l'organisme, soit au contraire induisent un déséquilibre dans sa composition ayant un caractère délétère pour l'hôte.

A. Impact de l'alimentation sur le MI

La nature du régime alimentaire est un acteur déterminant de la composition du MI. Les études réalisées au cours de la dernière décade ont mis à jour 3 propriétés du MI en réaction à un régime alimentaire :

- Le MI est capable de répondre rapidement à une modification qualitative du régime alimentaire. Ainsi plusieurs études montrent une transformation de la composition du MI en quelques jours après une modification importante du régime¹²²⁻¹²⁴. De fait, il existe même des fluctuations des espèces bactériennes dépendantes du rythme circadien¹²⁵.
- En dépit d'une extrême rapidité d'adaptation aux changements alimentaires, le MI présente une résilience importante. Ainsi des habitudes alimentaires installées dans le temps influent avec force sur la composition à long terme du MI et ne peuvent être effacées par une modification courte de l'apport alimentaire dans le temps ¹²⁶;
- Enfin, la réponse à une modification de l'alimentation reste dépendante de l'individu. Ainsi, une augmentation de la prise de fibre alimentaire associée à un déficit calorique a été efficace dans l'augmentation de la diversité bactérienne chez des individus partant d'un microbiote intestinal pauvre mais n'a que peu modifié le MI des patients présentant déjà une diversité génique importante ¹²⁴.

L'impact de l'alimentation dans la diversité de composition du MI a été extrêmement étudiée chez les patients présentant un syndrome métabolique et une obésité et nous y reviendrons dans le chapitre suivant. De même, la consommation d'alcool impacte la diversité bactérienne et appauvrit le MI, favorisant le développement de lésions hépatiques ¹²⁷⁻¹²⁹.

B. Impact des médicaments

Les traitements médicamenteux sont des facteurs importants dans la modulation du MI.

1. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés avec des propriétés bactéricides et bactériostatiques capables, en fonction de leur spectre d'action, d'éliminer un certain nombre d'espèces bactériennes. Un traitement antibiotique impacte donc logiquement le microbiote intestinal soit de manière transitoire, soit au contraire de façon permanente et d'autant plus que l'antibiothérapie sera renouvelée ¹³⁰. L'utilisation de ces médicaments dans l'enfance est parfois corrélée à une composition altérée du MI et à un retard d'acquisition d'un MI stable ce qui peut avoir des répercussions pathologiques à l'âge adulte ^{131, 132}.

2. Autres médicaments

Parmi les xénobiotiques pouvant induire une modification du MI, nous citerons principalement les inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) utilisés chez les patients en surpoids victime de reflux et la metformine utilisée en cas de diabète. Les IPP, en supprimant l'acidité intestinale sont parfois inducteurs d'infections entériques (Salmonellose ; Campylobacteriose), d'une prolifération des bactéries intestinales et prédisposent par exemple à des infections à *Clostridium difficile* ^{121, 133-135}. La metformine a été associée à une modification de la composition du MI. En effet les patients diabétiques et obèses traités par metformine montrent une diminution globale de la diversité de leur MI et l'augmentation de certaines espèces comme *Akkermansia muciniphila*. Cet impact sur le MI est lié à l'activation de voies métaboliques impliquées notamment dans le métabolisme des lipides et des glucides ^{136, 137}.

D'autres médicaments influant sur la motilité du tractus digestif peuvent également modifier le MI impactant sa diversité et la digestion des nutriments ¹³⁸. Enfin, une méta-analyse récente a étudié l'impact de polythérapies communément utilisées sur le microbiote intestinal. Ils ont identifié que l'usage des IPP, des laxatifs et des antibiotiques avait le plus grand impact sur la composition du MI. Cette étude réaffirme l'interaction entre la prise médicamenteuse et le MI et ouvre la réflexion sur la nécessité d'approfondir les investigations relatives à la pharmacomicrobiomique et aux effets indésirables liés aux interactions avec le MI ¹³⁹.

C. Modifications par les fibres alimentaires

1. Fibres alimentaires

Les fibres alimentaires sont définies comme la partie comestible de la plantes, des extraits de plante ou des carbohydrates analogues, résistant à la digestion et à l'absorption dans l'intestin grêle et qui suivent une fermentation complète ou partielle dans le gros intestin¹⁴⁰. Les fibres alimentaires peuvent être classées en 4 groupes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques¹⁴¹:

- Fibres non-visqueuses, insolubles et non-fermentables (cellulose, lignine, hémicellulose) : très peu fermentées et présentant un effet laxatif ;
- Fibres non-visqueuses, solubles et fermentables (inuline, dextrine, amidon) : fermentées rapidement via l'action du MI ; peu d'effet laxatif ;
- Fibres visqueuses, solubles et fermentables (pectine, β -glucane, gomme guar) : formation d'un gel visqueux réduisant l'absorption des nutriments dans l'intestin et fermentées par le MI ;
- Fibres visqueuses, solubles, non-fermentables (Psyllium, méthylcellulose) : réduisent l'absorption des nutriments grâce aux propriétés gélifiantes et exercent un effet laxatif.

Une des nouvelles approches pour moduler le MI est l'utilisation de prébiotiques. Les prébiotiques sont définis comme « des aliments non-digestibles qui affectent bénéfiquement l'hôte en induisant une stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité d'une ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes du MI qui confère un bénéfice santé pour l'hôte » et dont les effets sont prouvés scientifiquement¹⁴². Les prébiotiques ont donc 3 caractéristiques :

- Une absence d'hydrolyse ou d'absorption stomachale ou dans l'intestin grêle ;
- Une capacité de substrat sélectif pour les bactéries commensales bénéfiques dans le côlon ;
- L'induction d'un bénéfice local ou systémique pour l'hôte après fermentation.

Suivant cette définition, certaines fibres alimentaires comme la pectine répondent au concept de prébiotiques bien que leurs effets n'aient pas été approuvés. A l'heure actuelle, seuls l'inuline, le lactulose, les fructo-oligosaccharides (FOS) et les galacto-oligosaccharides

(GOS) peuvent se targuer de cette appellation. La réponse à la fermentation des fibres dépend de la composition du MI de l'hôte mais également des propriétés physico-chimiques de la fibre utilisée et notamment le degré de méthylation et d'estérification du composé ainsi que des propriétés environnementales intestinales comme le pH^{143, 144}. De nombreuses études ont permis de montrer le bénéfice des fibres sur la santé humaine notamment dans les pathologies métaboliques comme l'obésité ou l'hypercholestérolémie^{145, 146}. Leurs effets bénéfiques découlent en partie de leurs propriétés physico-chimiques mais aussi de leur capacité d'interaction avec le MI. Plus la longueur de la chaîne polysaccharidique est courte plus le nombre de bactéries capables de la digérer est important. Inversement les fibres hautement polymérisées ne sont digérées que par un nombre restreint de bactéries¹⁴⁷. Si dans un premier temps les effets des prébiotiques semblaient limités à un enrichissement en *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, des analyses plus récentes ont démontré une action des fibres alimentaires sur d'autres espèces considérées comme bénéfiques pour l'homme telles que *Faecalibacterium prausnitzii*¹⁴⁸. Les fibres alimentaires exercent par ailleurs une action bénéfique pour l'hôte en influant sur la production des SCFAs et l'absorption ionique^{144, 149}. Enfin, les prébiotiques jouent un rôle au niveau immunitaire et favorisent l'immunité de l'hôte en augmentant la production des IgA (immunoglobulines A) et en modulant la production de cytokines¹⁴⁸.

L'association synergique d'un probiotique (défini comme des micro-organismes vivants, qui, administrés en quantité suffisante, fournissent un bénéfice en terme de santé à l'hôte) et d'un prébiotique est appelée symbiotique. L'utilisation des symbiotiques comme thérapeutique a été étudiée dans de nombreuses pathologies métaboliques dont la NAFLD et la NASH avec des résultats hétérogènes en fonction de l'association utilisée, des critères d'inclusion et des critères de jugements sélectionnés.

La pectine est une fibre alimentaire dont l'utilisation dans la prise en charge de pathologies métaboliques comme la NAFLD s'est révélée être une piste thérapeutique d'intérêt.

2. La pectine

a. Propriétés physico-chimiques

La pectine est une fibre végétale alimentaire appartenant à la famille des fibres solubles comme la gomme guar. Au sein des végétaux, la pectine revêt un rôle structural majeur en permettant l'adhésion et le maintien des cellules végétales entre elles ¹⁵⁰.

b. Structure moléculaire

La pectine est un ensemble d'hétéropolysaccharides complexes et est un constituant essentiel de la paroi des végétaux. Structurellement, la pectine présente un squelette linéaire simple composé d'homogalacturonanes soit des monomères d'acide D-galacturonique liés entre eux par des liaisons α -(1-4). Ces derniers représentent environ 65% de la molécule de pectine¹⁵¹. Les monomères d'acide D-galacturonique peuvent être méthyl-estérifiés ou O-acetyl-estérifiés au niveau de leurs groupes carboxyles ou hydroxyles ¹⁵².

Différents polysaccharides s'intercalent dans ce squelette primaire et constituent des régions dites « chevelues ». Les oses s'intercalant appartiennent à deux familles : les rhamnogalacturonanes de type I et de type II.

3. Sources de pectine

Les pectines sont retrouvées principalement dans les fruits et les légumes. Les sources majeures de pectine pour l'industrie alimentaire sont la pomme, l'écorce d'agrumes (citron, orange) et la pulpe de betterave sucrière¹⁵⁰. Du fait de leur caractère polyélectrolyte les pectines peuvent interagir entre elles et, en présence de calcium ou d'autres ions positifs divalents, sont capables d'adopter une structure gélifiée.

Une des caractéristiques principales de la pectine est son degré de méthylation (DM) qui correspond au pourcentage de groupements carboxyles des unités Ga1A (libres ou substitués) estérifiés par le méthanol ¹⁵³.

On distingue deux types de pectine :

- Les pectines hautement méthylées (HMP) correspondant aux pectines présentant un degré de méthylestérification supérieur à 50% ;
- Les pectines faiblement méthylées (LMP) correspondant aux pectines présentant un degré de méthylestérification inférieur à 50%.

Les HMP sont capables de former des gels en présence d'oses et à un pH acide tandis que les LMP forment des gels en présence de cations bivalents tels que le calcium ¹⁵⁰. Les propriétés

gélifiantes des pectines sont fonction de leur degré de méthylation, de la température et du pH. Ces caractéristiques particulières propres à chaque type de pectine impactent leur utilisation en biopharmaceutique, dans le circuit de l'industrie alimentaire et au niveau biotechnologique.

Comme les fibres alimentaires, la pectine est fortement étudiée d'un point de vue pharmaceutique tant pour ses propriétés structurales que pour son action pharmacologique.

Les propriétés physico-chimiques de la pectine lui confèrent une capacité à former des gels hydrophobes tridimensionnels résistants aux conditions gastro-intestinales. La pectine peut donc être envisagée comme intéressante dans la délivrance *in situ* de probiotiques. Une encapsulation de certaines bactéries par la pectine a montré une meilleure viabilité des produits en les protégeant de l'environnement gastrique. C'est par exemple le cas pour *Lactobacillus rhamnosus*¹⁵⁴.

De nombreuses études ont souligné le bénéfice de la pectine sur l'hypercholestérolémie. Les fibres solubles peuvent agir sur les concentrations de cholestérol de trois manières : en entravant la réabsorption des acides biliaires, en réduisant l'absorption du glucose ce qui diminue la production d'insuline et par conséquent le taux d'HMGCoA responsable de la synthèse du cholestérol dans le foie ; et en favorisant la production de SCFAs qui bloquent la synthèse hépatique de cholestérol¹⁵⁵. En fonction de sa viscosité, de son degré d'estérification et de son poids moléculaire, la pectine aura une action variable dans la diminution du cholestérol plasmatique. De plus elle est capable de former un gel visqueux qui se lie au cholestérol et aux acides biliaires et favorise alors leur excrétion et diminue leur réabsorption entéro-hépatique¹⁵⁴. La pectine peut impacter la digestion des lipides en formant un gel qui piège les lipides dans le tractus digestif. Ce processus altère leur diffusion et les rend inaccessibles aux lipases.

Une consommation en pectine est associée à l'augmentation de plusieurs populations bactériennes définies comme composantes d'un microbiote « sain » et notamment *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia* ou *Bifidobacterium*. La stimulation de la croissance de ces bactéries est différente suivant la structure de la pectine utilisée¹⁵⁶.

Chapitre 5: IMPACT DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA NAFLD/NASH

I. Axe foie-intestin

Le foie et l'intestin sont étroitement connectés anatomiquement et cette relation a été décrite pour la première fois en 1978 par Volta et al. comme l'axe « foie-intestin ». Le foie est irrigué via deux voies : l'artère hépatique et la veine porte. 70 à 75% de l'apport sanguin s'effectue par la veine porte qui draine le sang provenant des veines mésentériques du tractus digestif¹⁵⁷. Le foie est ainsi le premier réceptacle des produits intestinaux et reçoit les nutriments et les acides aminés absorbés dans un premier temps par les entérocytes mais également tous les métabolites bactériens voir des bactéries elles-mêmes¹⁵⁸. C'est cette connexion étroite et ce risque potentiel qui explique pourquoi l'immunité du foie décrite précédemment est si particulière. Un lien fort existe donc entre les deux organes et de nombreuses études ont montré que les perturbations de l'intégrité de cet axe pourraient jouer un rôle pivot dans la pathogenèse de la NAFLD^{159, 160}.

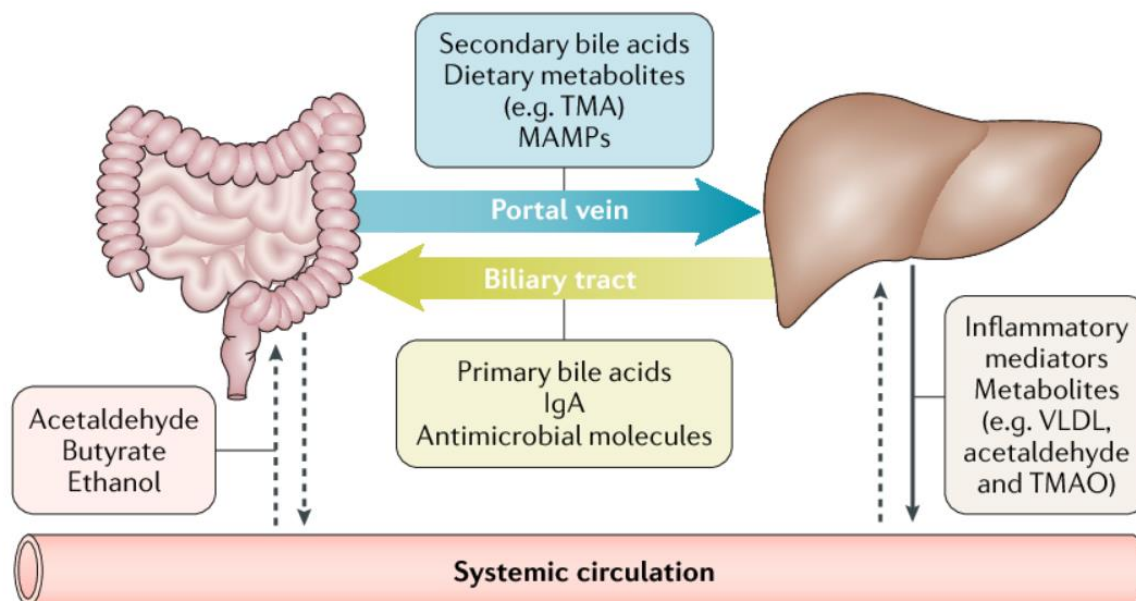


Figure 40: Axe foie-intestin; d'après Tripathi et al., 2018¹⁶⁸

Le foie transporte les acides biliaires et les molécules antimicrobiennes vers la lumière intestinale via le tractus biliaire. À l'inverse, les produits intestinaux tels que les métabolites bactériens sont transloqués vers le foie via la veine porte où ils influent sur les fonctions hépatiques. Enfin, la circulation systémique permet le transport de métabolites hépatiques vers l'intestin grâce au système capillaire.

MAMPs: microbial associated molecular patterns; TMA: trimethylamine; TMAO: trimethylamine N-oxide

II. Intégrité de la barrière intestinale

Si le foie est un pare-feu efficace contre les produits bactériens provenant de l'intestin, la première barrière se situe au niveau du tube digestif. La barrière intestinale est un environnement dynamique tridimensionnel constituée d'une barrière physique, d'une barrière biochimique et d'une barrière immunitaire^{157, 161}.

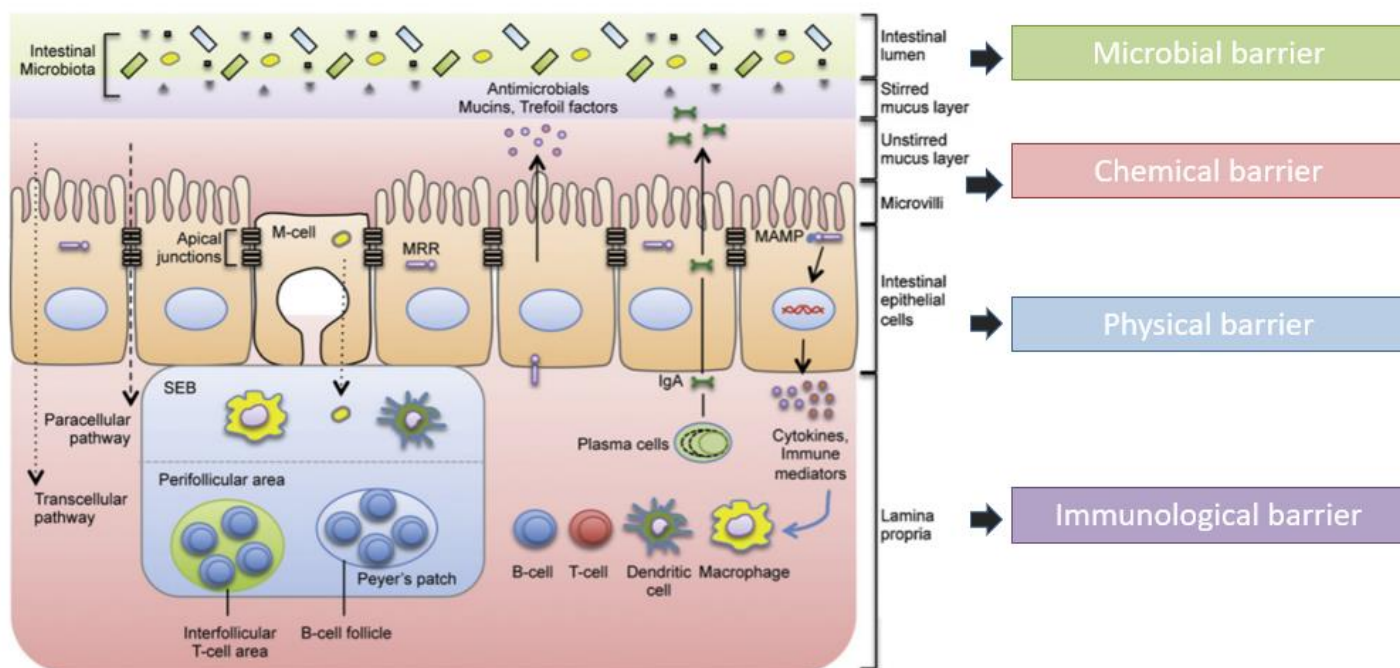


Figure 41: Les quatre composantes de la barrière intestinale, d'après Natividad et al., 2013¹⁶⁹

La barrière microbiologique correspond aux bactéries commensales. La barrière chimique correspond à la production de peptides anti-microbiens par l'épithélium intestinal. La barrière physique est constituée des cellules épithéliales reliées entre elles par des complexes jonctionnelles comprenant les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes ainsi qu'une couche de mucus. La barrière immune constituée du GAIT assure une immunité en permettant toutefois une tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires ou issus des bactéries commensales.

A. Composition de la barrière intestinale

1. Barrière physique

La fonction primaire de la barrière intestinale est de constituer un rempart entre les pathogènes et la circulation systémique en maintenant ces derniers dans la lumière intestinale. La barrière physique correspond à la couche muqueuse, au MI et à une monocouche de cellules intestinales épithéliales liées entre elles par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. L'épithélium intestinal est un environnement dynamique possédant une anatomie particulière. Au niveau de la lumière intestinale, l'épithélium se compose de villosités, replis de la muqueuse dont l'organisation structurelle

permet de maximiser la surface d'absorption des nutriments provenant de l'alimentation. On parle de bordure en brosse, sites où évoluent de nombreuses enzymes intestinales¹⁶². Des invaginations de l'épithélium accompagnent les villosités : ce sont les cryptes intestinales. Cette structure évolue le long du tractus digestif. En effet l'intestin grêle (du duodénum à l'iléon) recevant le bol alimentaire non digéré présente de longues villosités afin de favoriser l'extraction et l'absorption des nutriments. *A contrario*, le côlon qui reçoit uniquement les éléments digérés issus du bol alimentaire présente une superficie d'absorption plus restreinte composée uniquement de cryptes.

Plusieurs cellules constituent l'épithélium intestinal et ont des fonctions propres. Les cellules les plus nombreuses représentant plus de 80% de la population cellulaire, sont les cellules épithéliales, appelées entérocytes dans l'intestin grêle et colonocytes dans le côlon. Ces cellules ont pour fonction l'absorption des nutriments et électrolytes provenant de l'alimentation. On retrouve ensuite des cellules entéro-endocrines comme les cellules L qui jouent un rôle dans la production de peptides hormonaux tels que PYY ou GLP-1 et sont localisées au niveau des villosités. La production de mucus, elle, est dépendante de cellules caliciformes. Ces cellules sont en forme de vase et contiennent des grains de mucus qu'elles sécrètent de manière apocrine. L'intestin grêle contient des cellules spécifiques, les cellules de Paneth, localisées à la base des cryptes. Elles synthétisent des molécules de défenses contre les pathogènes et notamment le lysozyme et les défensines. Les cellules Tuft représentent 0,5% de la population cellulaires intestinales. Ces cellules, dont les caractéristiques restent pour la plupart méconnues, possèdent une réponse chimiosensorielle et ont récemment démontré une action dans la réparation mucoale et un rôle dans l'orchestration de l'immunité intestinale de type II ¹⁶³. Enfin les cellules M, (microfold cells) sont situées au niveau des plaques de Peyer et participent à la capture des antigènes dans la lumière intestinale. Elles agissent en incorporant ces antigènes par endocytose et les transfèrent aux cellules dendritiques qui elles les présentent aux lymphocytes B. L'interaction des pathogènes avec les cellules M peut être un point critique de l'infection bactérienne, certaines espèces les utilisant comme porte d'entrée dans le milieu intestinal ¹⁶⁴.

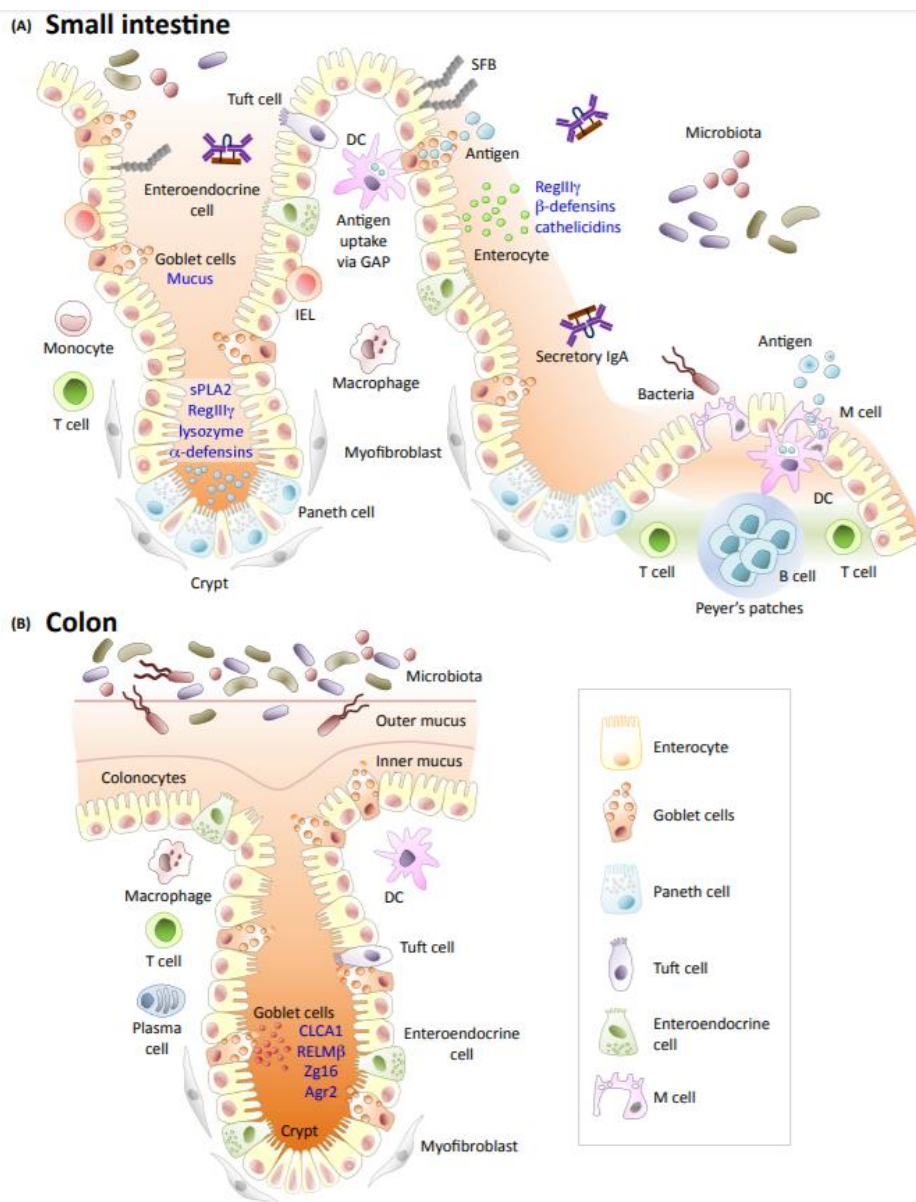


Figure 42 : Anatomie de la muqueuse intestinale dans l'intestin grêle et le côlon, d'après Allaire et al., 2018 ¹⁷³

Les entérocytes représentent le principal type de cellules retrouvé dans la muqueuse de l'intestin grêle. Ils participent à l'absorption des nutriments et sécrètent des molécules anti-microbiennes. Au fond des cryptes on retrouve les cellules de Paneth productrices de molécules anti-microbiennes. Les cellules M sont situées à proximité des plaques de Peyer et agissent en tant que cellules présentatrices d'antigènes aux cellules immunitaires. Les cellules caliciformes produisent du mucus et interagissent également avec les cellules immunitaires. Dans le côlon, les colonocytes et les cellules caliciformes sont les composants principaux de la muqueuse intestinale.

L'épithélium intestinal est en constant renouvellement et on note une prolifération continue des cellules souches localisées au fond des cryptes. Elles migrent ensuite le long de la crypte et des villosités pour atteindre la surface épithéliale où elles sont éliminées. Ces cellules souches sont capables de se différencier soit en cellules épithéliales simples, soit en cellules caliciformes, soit en cellules entéro-endocrine, soit en cellules de Paneth¹⁶⁵.

La jonction entre les entérocytes est sous la coupe de protéines spéciales : les protéines de jonctions serrées (cadhérines, claudine, occludine) et les jonctions adhérentes (JAM)¹⁶⁶. Ces protéines créent des ponts entre les cellules qui permettent de les souder entre-elles induisant la formation d'une barrière imperméable et scellée empêchant l'entrée de bactéries ou de certaines molécules¹⁶².

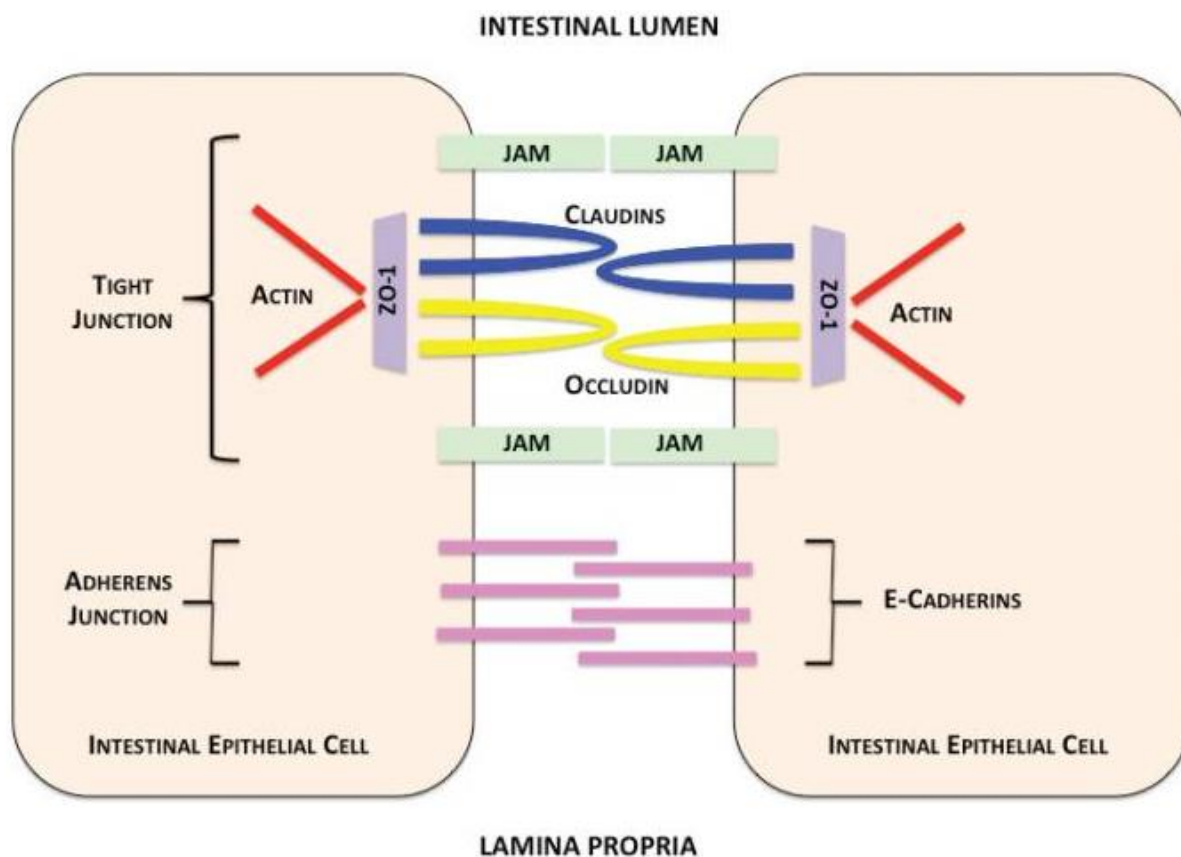


Figure 43: *Jonctions serrées ; d'après Hammer et al., 2015*¹⁷⁴

L'imperméabilité de la barrière intestinale est sous le contrôle d'un complexe de jonctions serrées.

Les jonctions serrées se composent des claudines et occludines, protéines transmembranaires attachées à une molécule adaptatrice ZO-1 qui lie les protéines de jonctions serrées à l'actine. Les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAMs) participent au complexe. D'autres composés interviennent dans la structure comme les molécules d'adhérence dont l'E-cadhérine

2. Barrière biochimique

La barrière biochimique comprend une couche de mucus ainsi qu'un vaste panel de molécules ayant des propriétés anti-microbiennes telles que les défensines.

Le mucus recouvre la surface apicale des cellules. Il est constitué de mucines qui sont des composés sécrétés par les cellules caliciformes. On distingue deux couches de mucus. Une couche de mucus interne et profonde, attachée aux cellules intestinales : cette couche est stérile et imperméable aux bactéries. Elle sert de barrière protectrice contre les pathogènes. La seconde couche de mucus externe est moins compacte. Elle se détache plus facilement et

contient des bactéries qui peuvent utiliser les glycanes contenus dans la couche de mucus comme substrat énergétique¹⁶⁷. Au niveau colique, ces deux couches sont principalement constituées d'une mucine glycosylée: MUC-2. MUC-2 est sécrétée par les cellules caliciformes et s'organise en complexe polymérique amorphe¹⁶². Les cellules caliciformes produisent également d'autres mucines dont MUC5AC et MUC 6 qui participent à la formation du gel muqueux¹⁶⁸. D'autres composés prennent part à la structure de la couche isolante de mucus dont le lysozyme, les Immunoglobulines A (IgA) et les défensines¹⁰⁹. Les peptides anti-microbiens sont produits en grande quantité par les cellules de l'épithélium intestinal et participent activement au maintien de l'immunité innée. Dans l'intestin grêle, les cellules de Paneth sont les principales cellules sécrétrices de peptides anti-microbiens et notamment des défensines Reg3 (Reg3 α chez l'homme et Reg3 γ chez la souris) et du lysozyme¹⁶⁹. Au niveau du côlon, dépourvu en cellules de Paneth, ce rôle de sécrétion et de production des peptides anti-microbiens est sous la houlette des colonocytes. Ces derniers produisent notamment les défensines Reg3 β et Reg3 γ ¹⁷⁰.

3. Barrière immunitaire

Les cellules de l'immunité innée et adaptative sont présentes dans la lamina propria. La barrière immunitaire est constituée d'immunoglobulines sécrétoires, les IgA, ainsi que de follicules lymphoïdes (plaques de Peyer) remplis d'une variété de cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes B et T, cellules dendritiques, macrophages). Des lymphocytes intra-épithéliaux viennent compléter cette barrière immunitaire. L'association des plaques de Peyer et de la lamina propria est une structure répondant au nom de GALT (gut-associated lymphoïd tissues). Parmi les cellules, on retrouve également des cellules lymphoïdes innées (ILCs) et en particulier les ILC3s, importantes pour réguler l'homéostasie entre l'hôte et son microbiote.

Le système immunitaire de l'hôte entre en interaction avec le microbiote intestinal pour maintenir l'homéostasie : il doit en effet protéger l'hôte d'une attaque d'agents pathogènes tout en exerçant une certaine tolérance vis-à-vis des bactéries commensales bénéfiques pour l'organisme. Le microbiote intestinal est essentiel à la maturation du système immunitaire et au maintien de son homéostasie^{171, 172}. L'équilibre est cependant plus complexe que cette interaction unilatérale, puisque le système immunitaire via la production

de cytokines et chimiokines va également orchestrer la régulation de la production du mucus et des peptides anti-microbiens et par voie de conséquence la composition du MI.

Les bactéries intestinales agissent sur la régulation du métabolisme et le fonctionnement global de l'hôte en produisant une myriade de métabolites qui possèdent des fonctions propres et seront détaillés par la suite. Parmi ces métabolites on note en particulier la production d'acides gras à chaîne courte issus de la fermentation de fibres alimentaires et de ligands du récepteurs aux hydrocarbures aromatiques polycycliques AhR extrêmement impliqués dans la stimulation de cellules lymphoïdes innées productrices d'IL-22¹⁷³.

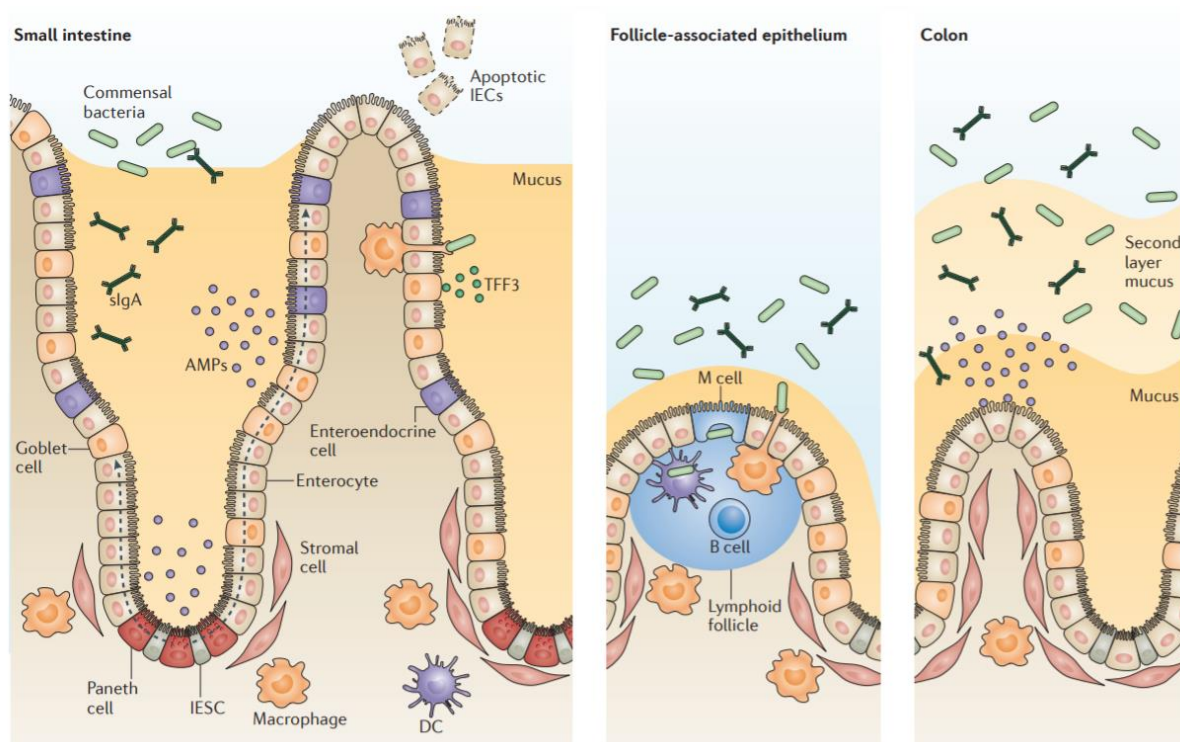


Figure 44: Physiologie de la barrière intestinale d'après Peterson et al., 2014¹⁷⁹

Les cellules intestinales épithéliales forment une barrière chimique et physique qui maintiennent la ségrégation entre la flore intestinale commensale de la lumière intestinale et le système mucosal. Une niche contenant les cellules progénitrices épithéliales permet le renouvellement de la couche de cellules épithéliales avec migration des cellules différenciées le long d'un axe crypte-villi (flèche en pointillés).

Les cellules de Paneth et les cellules caliciformes sécrètent du mucus et des protéines anti-microbiennes favorisant l'exclusion des bactéries de la surface épithéliale. Les IgA vont participer aux fonctions immunitaires de la barrière intestinale. Les cellules M permettent elles le transport d'antigènes et de bactéries vivantes de la barrière épithéliales aux cellules dendritiques.

B. Rôle de la barrière intestinale

La barrière intestinale joue un rôle primordial comme rempart contre les toxiques (toxines, micro-organismes pathogènes, métabolites bactériens) et participe au maintien de l'homéostasie intestinale^{174, 175}.

En cas de dysbiose, la barrière intestinale est altérée et on assiste alors à une augmentation de la perméabilité intestinale suivant un dommage du réseau de jonctions serrées. Cette augmentation de la perméabilité intestinale facilite la translocation de dérivés bactériens toxiques tels que le LPS ou les PAMPs dans la circulation sanguine. De plus, l'activité mucoale est elle aussi impactée et promeut un état inflammatoire local. Les produits bactériens (LPS ou ADN bactérien) voire des bactéries intactes circulent vers le foie via la circulation portale. Leur liaison sur les toll-like récepteurs (TLR) hépatiques entraîne une réaction inflammatoire aboutissant à l'altération des hépatocytes. Ce phénomène peut expliquer en partie l'impact de l'axe foie-intestin dans le développement et la progression des hépatopathies ^{174, 176}.

Si l'altération de la barrière intestinale associée à une augmentation de sa perméabilité est bien documentée dans la maladie alcoolique du foie, son implication dans la NAFLD est plus controversée. Si on pense que les patients NAFLD et NASH présentent une augmentation de la translocation bactérienne via une altération des fonctions de la barrière intestinale, les résultats des expériences menées chez l'homme et chez l'animal restent hétérogènes ¹⁷⁴.

De nombreuses études mettent en évidence une altération de l'intégrité de la barrière intestinale chez des souris soumises à un régime riche en graisses après mesure de la translocation des produits bactériens dans la circulation sanguine. On recense notamment une augmentation du LPS et une diminution de l'une des protéines de jonctions serrées à savoir l'occludine, la zonula occludens 1 (ZO-1) et la molécule JAM-A (junctional adhesion molecule A) ^{177 159}. Chez l'homme, une méta-analyse évaluant l'intégrité de la barrière intestinale après mesure de l'excrétion urinaire d'un composé, décrit une augmentation de la perméabilité intestinale chez 39.1% des patients NAFLD. Par ailleurs, une étude menée sur 19 patients NASH montrait une augmentation de la perméabilité intestinale pour 42.1% de l'effectif ^{177, 178}. La prévalence réelle de l'augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients NAFLD/NASH reste discutable tant par les mesures d'évaluation utilisées que par le nombre réduit de patients intégrés dans ces analyses.

Chez les modèles murins comme pour les patients NAFLD, une augmentation du LPS plasmatique est décrit. Le passage du LPS dans le sang après altération des jonctions serrées se dirige vers les hépatocytes et participe activement à la réponse inflammatoire et donc au développement de la fibrose ¹⁷⁹. Ce LPS produit majoritairement par les bactéries Gram-négatives est connu pour son implication dans le développement de l'insulino-résistance

après interaction avec le TLR-4 et activation de la voie NFκB¹⁷⁷. Le LPS peut également se fixer au TLR-9 et induire la production d'IL-1β par les cellules de Kupffer¹⁸⁰. L'intégrité de la barrière intestinale et la translocation bactérienne qui en découle pourraient participer mais de manière limitée et secondaire au développement de la NAFLD/NASH¹⁷⁶. Cependant, une étude menée chez des patients NASH a montré que l'administration de JKB-121, un inhibiteur de TLR-4, ne permettait pas de réduire la stéatose hépatique ni la fibrose chez ces patients.

Indépendamment de ces données, un régime alimentaire riche en graisses pourrait être à l'origine d'une altération de la couche de mucus. Il a ainsi été mis en évidence une dégradation de MUC-2 et donc un impact sur les composants de la couche de mucus de l'intestin lié à la dysbiose. Une des fonctions de la couche de mucus intestinale est de séparer la masse bactérienne de l'hôte, empêchant notamment la translocation des bactéries et produits bactériens dans la circulation sanguine¹⁸¹.

Ces altérations de la barrière intestinale sont donc encore à étudier chez l'homme et il est probable que la nature du régime alimentaire, comme la quantité de fibres alimentaires consommées, soient à considérer pour arriver à des conclusions pertinentes.

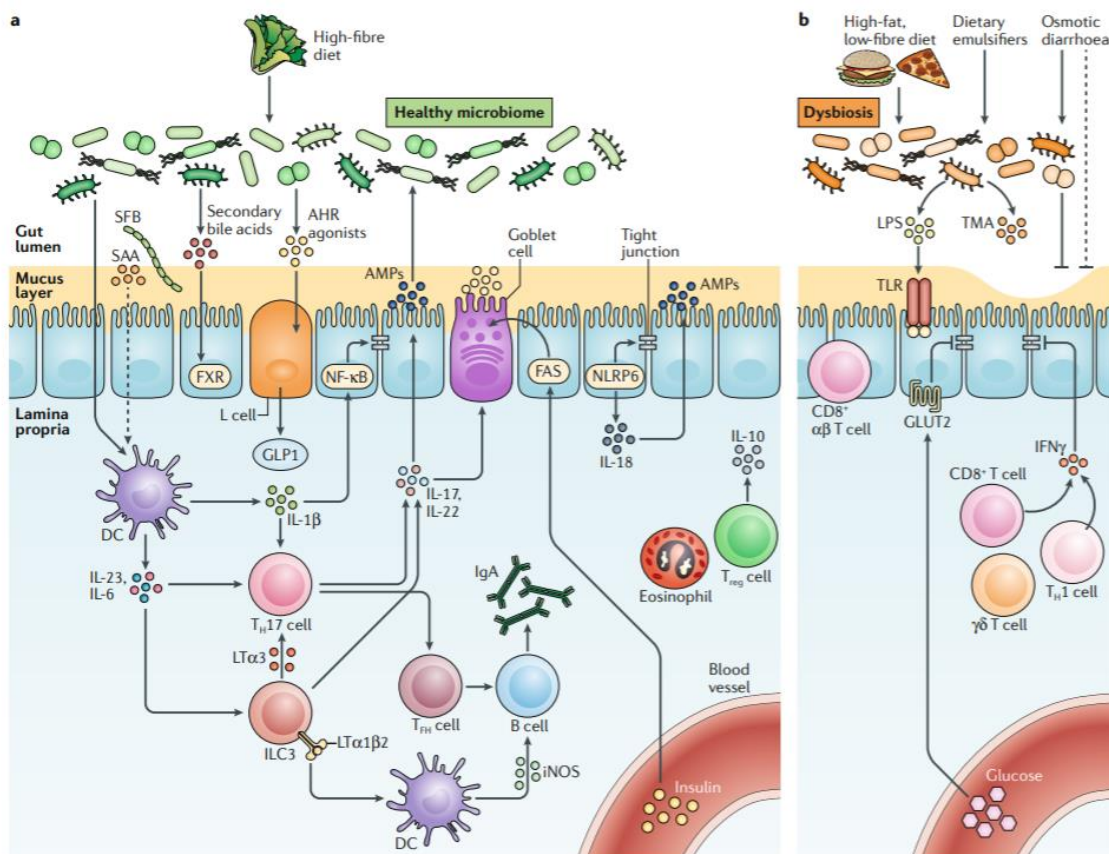


Figure 45: Maintenance de l'intégrité de la barrière intestinale d'après Tilg et al., 2019¹⁸³

L'intégrité de la barrière intestinale est préservée grâce à une variété de facteurs exogènes et endogènes.

Les facteurs exogènes incluent le microbiote intestinal, les métabolites bactériens et des composants issus du régime alimentaire.

Lors d'un régime sain riche en fibres, le MI maintient l'intégrité intestinale via des mécanismes directs impliquant les cellules dendritiques en induisant la production de mucus, de peptides antimicrobiens et d'IgA. Ces événements associés à un milieu immun tolérante favorisent le maintien de l'homéostasie. D'autres acteurs comme les acides biliaires et les agonistes d'AHR participent au maintien de l'intégrité de la BI. Les facteurs endogènes comprennent la production de peptides anti-microbiens au mucus à d'autres facteurs comme l'insulinémie.

Lors d'une dysbiose induite notamment par un régime alimentaire délétère, des dérangements métaboliques apparaissent avec augmentation du LPS et induction des voies de signalisations via TLR. La couche de mucus se dégrade ce qui favorise l'endotoxémie. On assiste à des modifications pro-inflammatoires qui associées à l'augmentation de la perméabilité intestinale participent à l'inflammation métabolique. Une hyperglycémie favorise également le dysfonctionnement de la barrière intestinale via GLUT2.

FXR, farnesoid X receptor; GLP, glucagon-like peptide; IFN γ , interféron- γ ; ILC3, type 3 innate lymphoid cell; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LT, lymphotoxin; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NLRP3, NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3; SAA, serum amyloid A; SFB, segmented filamentous bacteria; TFH cell, T follicular helper cell; TH cell, T helper cell; TMA, trimethylamine; Treg cell, regulatory T cell.

III. Impact de la dysbiose intestinale dans la NAFLD

A. Impact du rôle du MI dans la prise de poids

Les premières études mettant en évidence le rôle causal du MI dans la prise de poids ont été réalisées chez le rongeur grâce à l'utilisation de souris axéniques ne possédant pas de microbiote intestinal. Ces souris présentent une résistance aux effets délétères induits par un régime riche en graisses ou en carbohydrates. Ainsi des souris conventionnelles, dotées d'un microbiote intestinal actif et élevées normalement, possèdent une masse grasse 40% plus importante que celle des souris axéniques malgré une consommation de régime moins

importante que ces dernières. La transplantation fécale de MI issu des souris conventionnelles aux souris axéniques induit une augmentation de 60% de la masse grasse en deux semaines sans modification du régime ou de sa consommation ¹⁸². De la même manière, il a été démontré que les souris axéniques présentent une altération de la capacité à absorber les lipides de l'alimentation par rapport aux souris conventionnelles ce qui pourrait expliquer leur résistance au régime gras. Un régime riche en graisses impacte la composition du MI et le transfert de ce MI aux souris axéniques sous régime normal promeut l'absorption des lipides ¹⁸³. Ces observations affirment le rôle des bactéries dans l'utilisation de l'énergie issue de l'alimentation. L'utilisation énergétique varie selon les espèces bactériennes et il a été démontré qu'une élévation minime du ratio Firmicutes/Bacteroidetes est associée à une augmentation de l'absorption énergétique d'environ 150 kCal ¹⁸⁴. Une normalisation du poids, après régime hypocalorique chez des patients obèses permet de restaurer le ratio Firmicutes/Bacteroidetes similaire à celui observé chez des patients normo-pondérés ¹⁸⁵. D'autres variations bactériennes ont été associées à l'obésité et notamment des changements dans les classes des *γ-Proteobacteria* et *Erysipelotrichia* des patients ayant un régime déficient en choline. La présence des *γ-Proteobacteria* a été associée à un risque plus élevé de développer un foie stéatosique en fonction de la quantité de choline dans le régime ¹⁸⁶.

B. Impact de l'implication du MI dans la NAFLD

1. Impact du MI dans le syndrome métabolique et dans la NAFLD

Une des premières études menées sur l'impact du MI dans le syndrome métabolique et la NAFLD a été réalisée chez des souris déficientes en toll-like receptor 5 (TLR5) ¹⁸⁷. Le TLR-5 est largement exprimé dans la muqueuse intestinale et reconnaît la flagelline bactérienne. Les souris déficientes (KO) en TLR5 présentent une augmentation de la masse grasse viscérale et une altération de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline en comparaison aux souris sauvages (WT). Les souris KO pour TLR5 soumises à un régime enrichi en graisse montraient un gain de poids supérieur à celui des souris WT, associé à une hyperglycémie, une stéatose hépatique et des infiltrats inflammatoires au niveau des îlots pancréatiques témoins d'une perte de sensibilité à l'insuline. L'ajout d'un régime riche en graisses était donc responsable d'une aggravation du syndrome métabolique chez ces souris. Une restriction alimentaire chez ces souris permettait de corriger l'obésité mais pas de restaurer une sensibilité adéquate à l'insuline. Enfin, la transplantation de fèces issus de ces souris KO à des

souris axéniques conférait de nombreux signes et marqueurs du syndrome métabolique aux souris receveuses marquant l'influence du MI dans le développement de la pathologie.

Une autre étude, réalisée sur des souris déficientes en inflammasome a montré que le MI issu de ces souris induisait une progression de la stéatose et une augmentation du taux de TNF α . Ce phénotype était également transmissible par le MI, puisque des souris WT partageant la cage des souris KO, présentaient un phénotype comparable aux souris KO ¹⁸⁸.

Ces deux études, démontraient d'une part, que la génétique de l'hôte était capable d'impacter la composition du MI ; d'autre part, que le phénotype en découlant était ensuite transmissible via le MI. Dans le cadre de la NAFLD, ces premières études soulignent indéniablement que la composition du MI est impliquée dans la susceptibilité à développer la pathologie.

Une étude menée par Leroy et al., a permis de conclure quant au rôle causal du MI dans la NAFLD. Dans cette étude, deux populations de souris soumises à un régime riche en graisses sont étiquetées : les souris dites « répondeuses » qui présentent une altération de la tolérance au glucose et une inflammation systémique à bas bruit; et les souris « non-répondeuses » qui présentent elles une glycémie adéquate et aucun marqueur de l'inflammation. Le transfert de MI issu des souris répondeuses à une population de souris axéniques soumises à un régime enrichi en graisses induit le développement des mêmes altérations fonctionnelles caractéristiques de la NAFLD. Inversement, le transfert de MI issu des souris non-répondeuses induit un phénotype « normal » chez les axéniques receveuses soumises au même régime enrichi en graisses. Les analyses de microbiote effectuées entre les deux populations de souris donneuses mettent en évidence des disparités de composition et prouvent qu'un phénotype est transmissible par implantation du MI ¹⁸⁹.

L'ensemble de ces études confirme l'implication du MI comme facteur causal dans le développement et la progression de la NAFLD et la susceptibilité individuelle liée à cette hépatopathie.

2. Qualité de la dysbiose au cours de la NAFLD

La NAFLD et la NASH sont en partie liées à une dysbiose impactant la composition qualitative et quantitative du MI. Des modifications de la composition bactérienne peuvent être présentes au niveau de tous les taxons bactériens et jusque lors il reste difficile d'incriminer

une espèce en particulier. Les études de MI sont majoritairement construites sur le séquençage de l'ARN 16S des bactéries dans les selles. Ce séquençage est donc partiel et permet majoritairement de renseigner les genres bactériens présents et parfois quelques espèces. Les comparaisons entre les différentes études publiées vont donc dépendre de la profondeur du séquençage réalisé et des banques de données utilisées pour interpréter ces résultats. Cela peut expliquer au moins en partie les différences observées et la difficulté à tirer de ces données un consensus précis de bactéries associées ou non à la pathologie.

De nombreuses études relatives aux différences de composition du MI entre les patients et les individus sains ont été publiées. Parmi elles, l'étude de Leroy et al. identifie que les souris répondeuses au régime gras montrent une augmentation du phylum Firmicutes, des genres *Barnesiella* et *Roseburia*, et de certaines espèces comme *Lachnospiraceae bacterium* et de *Barnesiella intestinihominis*. Les souris non-répondeuses présentaient quant à elles une augmentation du genre *Allobaculum* et de l'espèce *Bacteroides vulgatus*. Dans une autre étude menée sur des souris axéniques recevant du MI de patients NASH ou de patients contrôles, les différences de séquençage montraient une augmentation des Firmicutes et notamment des Streptococcaceae ainsi qu'une élévation des Protéobactéries et en particulier des Enterobacteriaceae dans le MI des souris recevant le microbiote des patients NASH par rapport au MI des contrôles ¹⁹⁰.

Chez l'homme, de nombreuses études ont été menées pour tenter de déterminer les spécificités propres au MI dans la NAFLD et dans la NASH, qui sont résumées dans le tableau 1 ¹⁹¹.

Dans une étude comparant les patients NAFLD à des contrôles sains, une augmentation de 20% des Bacteroidetes et une diminution de 24% des Firmicutes a été observée dont une diminution de bactéries impliquées dans la production des SCFAs (Lachnospiraceae et Lactobacillaceae) et les Ruminococcaceae intervenant dans la déhydroxylation de l'acide cholique ¹⁹². Dans une étude menée sur 37 patients obèses avec une NAFLD, les patients fibrotiques présentaient une augmentation des Fusobacteria (dont la famille des Fusobacteriaceae) et des Bacteroidetes, et une diminution des Firmicutes (dont les familles des Ruminococcaceae et des Lachnospiraceae et les genres de *Streptococcus* et de *Dorea*) et d'Actinobacteria (dont la famille des Coriobacteriaceae) ¹⁹³. Zhu et al. témoignent eux d'une

augmentation des Proteobacteria, des Enterobacteria et d'*Escherichia coli* chez les patients NAFLD ¹⁹⁴.

Les études attestent également de variations de composition microbienne en fonction du stade de NAFLD et du degré de la fibrose. Ainsi, une étude de Boursier et al., montrait une augmentation de *Bacteroides* et une diminution de *Prevotella* chez les patients avec une NASH ; l'abondance des *Bacteroides* étant associée de manière indépendante avec la présence d'une NASH. Une augmentation relative des *Bacteroides* et des *Ruminococcus* et une diminution des *Prevotella* étaient associées à un stade de fibrose F2. De plus, l'analyse multivariée soulignait une corrélation entre le taux de *Ruminococcus* et le développement d'une fibrose avancée ¹⁹⁵.

Dans une autre étude, l'analyse 16S montrait que les patients avec une NAFLD modérée étaient porteurs de quantités plus importantes de Firmicutes et d'espèces telles que *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum*, et *Faecalibacterium prausnitzii*. Les patients avec une fibrose avancée présentaient quant à eux une augmentation de Proteobacteria au niveau du phylum et un taux plus important de *Bacteroides vulgatus* et d'*Escherichia coli*. Une analyse des voies métaboliques associées à l'activité de ces bactéries démontrait chez les patients avec une fibrose importante que les bactéries présentes en quantité élevée sont en relation avec les voies engagées dans le métabolisme glucidique et des SCFAs. Les voies métaboliques impliquées chez les patients NAFLD à un stade moindre de la pathologie étaient différentes au regard des SCFAs impactés ¹⁹.

Enfin, le microbiote intestinal des enfants et des adolescents diagnostiqués d'une NAFLD ou d'une NASH présente aussi des caractéristiques propres. On notera ainsi une augmentation de l'abondance des *Gammaproteobacteria* et de *Prevotella* ¹⁹⁶.

Une revue récente menée par l'équipe de Karine Clément a recensé l'ensemble des études portant sur l'analyse du MI dans la NAFLD (prenant en compte tous les stades de la stéatose simple à la NASH) et la NAFLD avec fibrose et permet de dresser après comparaison une signature du MI au stade NAFLD/NASH prouvé histologiquement et au stade fibrose ¹⁹⁷.

Ainsi, au stade NAFLD/NASH on note:

- Pour les phyla :
 - o une augmentation des Verrumicrobia, des Fusobacteria et des Protéobactéria

REVUE DE LITTÉRATURE : *Impact du microbiote intestinal dans la NAFLD/NASH*

- des résultats discordants pour les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Actinobacteria
- Pour les classes :
 - Une augmentation des Gammaproteobacteria, des Bacteroidia et des Epsilonproteobacteria
 - Une diminution des Clostridia
- Pour les familles :
 - Une augmentation des Streptococcaceae, des Enterobacteriaceae, des Pasteurellaceae, des Veillonellaceae, des Erysipelotrichaceae, des Kiloniellaceae et des Succinivibrionaceae
 - Une diminution des Peptostreptococcaceae, des Ruminococcaceae, des Bifidobacteriaceae et des Rikenellaceae
 - Des résultats discordants pour les Lachnospiraceae, les Prevotellaceae, les Lactobacillaceae et les Porphyromonadaceae
- Pour les genres :
 - Une augmentation des *Shigella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Acidaminococcus*, *Akkermansia*, *Eggerthella*, *Flavonifractor*, *Escherichia*, *Lachnospiraceae incertae sedis*, *Robinsoniella*, *Dorea*, *Porphyromonas*, *Anaerococcus*, *Bradyrhizobium*, *Peptoniphilus*, *Allisonella*, *Parabacteroides*
 - Une diminution des *Haemophilus*, *Eubacterium*, *Coprobacter*, *Holdemania*, *Subdoligranulum*, *Coprococcus*, *Moryella*, *Pseudobutyrvibrio*, *Anaerosporobacter*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira* et *Lactobacillus*
 - Des résultats discordants pour les *Prevotella*, *Oscillibacter*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, et *Roseburia*
- Pour les espèces :
 - Une augmentation *Clostridium coccoides*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia Coli*, *Eubacterium rectale* (augmentée dans la NAFLD modérée)
 - Une diminution de *Bacteroides fragilis*.

Le stade NAFLD associé à une fibrose présente des caractéristiques propres :

- Au niveau des phyla:
 - Augmentation des Fusobacteria

REVUE DE LITTÉRATURE : *Impact du microbiote intestinal dans la NAFLD/NASH*

- Des résultats discordants pour les Firmicutes, les Bacteroidetes, et les Proteobacteria
- Pas de données pour les Verrumicrobia et les Actinobacteria
- Au niveau de la classe :
 - Augmentation des Gammaprotéobacteria
- Au niveau des familles :
 - Augmentation des Streptococcaceae, des Enterobacteriaceae, des Pasteurellaceae, des Veillonellaceae, des Fusobacteriaceae, des Enterococcaceae, des Staphylococcaceae,
 - Diminution des Ruminococcaceae, des Lachnospiraceae et des Prevotellaceae, des Bacteroidaceae et des Clostridiales XIV
- Au niveau des genres :
 - Une augmentation des *Shigella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Megasphaera*, *Atopobium*, *Dialister*, *Clostridium*, *Streptococcus*,
 - Une diminution des *Haemophilus*, *Eubacterium*, *Neisseria*, *Alistipes* et *SR1 genera incertae sedis*
- Au niveau des espèces :
 - Une augmentation *Bacteroides fragilis*, de *Ruminococcus obeum* CAG:39 et d'*Escherichia Coli*
 - Une diminution d'*Eubacterium rectale*

L'insulino-résistance est également associée à des modifications de composition du microbiote intestinal. Une diminution du phylum Firmicutes et des taux de Bifidobactéries ont ainsi été rapportés chez les patients diabétiques par rapport aux patients sains¹⁹⁸. De même, au niveau du genre, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila* et *Bacteroides vulgatus* sont retrouvés en proportion moindre chez les patients diabétiques. Enfin, *Faecalibacterium prausnitzii* associée à une action anti-fibrotique est également diminuée en cas de résistance à l'insuline. Entre les patients NAFLD/NASH et les patients DT2, certaines signatures microbiennes sont similaires. Par exemple on observe dans les deux pathologies une diminution du genre *Lactobacillus* et une augmentation d'*Escherichia Coli*¹⁹⁷. Par ailleurs, l'obésité et le DT2 partagent également des traits communs avec notamment une diminution

de *Roseburia intestinalis* et *F. prausnitzii* et du genre *Oscillospira* témoin de l'inter-relation de ces pathologies.

L'ensemble des données recueillies par séquençage 16S des fèces des différentes cohortes de patients montre l'existence d'une dysbiose entre les patients NAFLD/NASH et les patients sains et témoigne de variations des bactéries impliquées en fonction du développement de la maladie et du stade de fibrose considéré^{19, 105, 189, 190, 193-196, 199-206}. De manière globale, la NAFLD/ NASH et la NAFLD avec fibrose sont associées à une diminution des bactéries Gram positif et à une augmentation des bactéries Gram négatif¹⁹⁷. Des discordances sont relevées dans la littérature et peuvent en partie s'expliquer par l'avancée de la maladie. Le stade de fibrose influence par exemple la signature microbienne. De même, les stades NAFLD et NASH sont souvent associés à des pathologies sous-jacentes comme l'obésité et le DT2 qui possèdent leur propre signature bactérienne ce qui rend difficile la classification des patients et s'avère fluctuant selon les études.

Des analyses complémentaires sont donc indispensables pour isoler les espèces bactériennes incriminées dans la pathologie au regard des résultats hétérogènes qui ressortent de la classification variable des patients selon les différentes études.

IDENTITÉ	NIVEAU TAXONOMIQUE	PHYLAs D'APPARTENANCE	NAFLD	NASH	FIBROSE	REF
Firmicutes	Phyla		↑↓	↑↓	↑↓	19; 99; 196; 197; 201; 206; 209; 211; 212
Bacteroidetes			↑↓	↑↓	↑↓	208
Actinobacteria			↑↓	↑↓	↑↓	206
Verrucomicrobia			↑	↑	?	206
Fusobacteria			↑	↑	↑	208; 210
Proteobacteria			↑	↑	?	19; 197; 201; 206; 208; 210
Gammaproteobacteria	Classe	Proteobacteria	↑	↑	↑	208
Epsilonproteobacteria			↑	↑	?	203
Bacteroidia		Bacteroidetes	↑	↑	?	199
Clostridia		Firmicutes	↓	↓	?	199
Streptococcaceae	Famille	Firmicutes	↑	↑	↑	97; 208; 210
Veillonellaceae			↑	↑	↑	209; 210
Erysipelotrichaceae			↑	↑	?	208
Peptostreptococcaceae			↓	↓	?	199
Ruminococcaceae			↓	↓	↓	199; 201; 208; 209; 213
Lachnospiraceae			↑↓	↑↓	↓	201; 206; 208-210; 213
Lactobacillaceae			↑↓	↑↓	↓	199; 209
Enterococcaceae			?	?	↑	213
Staphylococcaceae			?	?	↑	213
Clostridiales XIV			?	?	↓	213
Enterobacteriaceae		Proteobacteria	↑	↑	↑	197; 201; 208; 213
Pasteurellaceae			↑	↑	↑	209; 210
Kiloniellaceae			↑	↑	?	209
Bacteroidaceae			?	?	↓	209
Succinivibrionaceae			↑	↑	?	212
Rikenellaceae			↓	↓	?	208; 211
Prevotellaceae		Bacteroidetes	↑↓	↑↓	↓	201; 202; 208
Porphyromonadaceae			↑↓	↑↓	?	199; 209
Coriobacteriaceae		Actinobacteria	?	?	↓	200
Bifidobacteriaceae	↓		↓	?	201	
Fusobacteriaceae	Fusobacteria	?	?	↑	210	

Tableau 1: Qualité de la dysbiose dans la NAFLD, la NASH et la fibrose (1/3)

↑↓= résultats discordants ; ? : non étudié ; d : retrouvé dans le DT2 ; o : retrouvé dans l'obésité

REVUE DE LITTÉRATURE : Impact du microbiote intestinal dans la NAFLD/NASH

IDENTITÉ	NIVEAU TAXONOMIQUE	PHYLUM D'APPARTENANCE	NAFLD	NASH	FIBROSE	REF
<i>Shigella</i>	Genre	Proteobacteria	↑	↑	?	208
<i>Escherichia</i>			↑	↑	?	201; 206
<i>Haemophilus</i>			↓	↓	↓	206; 210
<i>Neisseria</i>			?	?	↓	210
<i>Bradyrhizobium</i>			↑	↑	?	211
<i>Bacteroides</i>		Bacteroidetes	↑↓ ^o	↑↓ ^o	↑ ^o	202
<i>Coproacter</i>			↓	↓	?	206
<i>Alistipes</i>			↓	↓	?	105; 201
<i>Prevotella</i>			↑↓ ^o	↑↓ ^o	↑↓ ^o	185-186; 193; 208
<i>Barnesiella</i>			↑	?	?	196
<i>Porphyromonas</i>			↑	↑	?	201
<i>Parabacteroides</i>			↑	↑	?	212
<i>Ruminococcus</i>			↑	↑	↑	202
<i>Acidaminococcus</i>			↑	↑	?	206
<i>Flavonifractor</i>			↑	↑	?	206
<i>Lachnospiraceae incertae sedis</i>		Firmicutes	↑	↑	?	208
<i>Robinsoniella</i>			↑	↑	?	208
<i>Dorea</i>			↑	↑	↓	209; 211
<i>Anaerococcus</i>			↑	↑	?	211
<i>Peptoniphilus</i>			↑	↑	?	211
<i>Allisonella</i>			↑	↑	?	212
<i>Megasphaera</i>			?	?	↑	210
<i>Dialister</i>			?	?	↑	210
<i>Clostridium</i>			?	?	↑ ^d	105
<i>Streptococcus</i>			?	?	↑↓	105
<i>Eubacterium</i>			↓	↓	?	201; 206; 213
<i>Holdemania</i>			↓	↓	?	206
<i>Subdoligranulum</i>			↓	↓	?	206
<i>Caprococcus</i>			↓	↓	?	199; 201; 206
<i>Moryella</i>			↓	↓	?	199
<i>Pseudobutyryivibrio</i>			↓	↓	?	199
<i>Anaerospirabacter</i>			↓	↓	?	199; 212
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>			↑↓	↑↓	?	201
<i>Oscillospira</i>			↑ ^o	↑ ^o	?	211
<i>Oscillibacter</i>			↑↓	↑↓	?	206; 209
<i>Lactobacillus</i>			↑ ^d	↑ ^d	?	199; 209
<i>Blautia</i>			↑↓	↑↓	?	201; 202; 208; 211
<i>Roseburia</i>			↑ ^d	↑ ^d	?	195; 199; 201; 209
<i>Eggerthella</i>			↑	↑	?	206
<i>Atopobium</i>			?	?	↑	210
<i>Bifidobacterium</i>			↑ ^o	↑ ^o	?	201; 206
<i>Akkermansia</i>			Verrucomicrobia	↑	↑	?
<i>SRI genera incertae sedis</i>	?			?	↓	210

Tableau 1: Qualité de la dysbiose dans la NAFLD, la NASH et la fibrose (2/3)

↑↓ = résultats discordants ; ? : non étudié ; d : retrouvé dans le DT2 ; o : retrouvé dans l'obésité

REVUE DE LITTÉRATURE : *Impact du microbiote intestinal dans la NAFLD/NASH*

IDENTITÉ	NIVEAU TAXONOMIQUE		NAFLD	NASH	FIBROSE	REF
<i>Clostridium coccoïdes</i>	Espèces	Firmicutes	↑	↑	?	201
<i>Eubacterium rectale</i>			↑	↑	↓ ^d	19
<i>Ruminococcus obeum</i> CAG:39			↑	?	↑	19
<i>Lachnospiraceae bacterium</i>			↑	?	?	196
<i>Bacteroides fragilis</i>		Bacteroidetes	↓	↓	↑	19; 202
<i>Barnesiella intestinihominis</i>			↑	?	?	196
<i>Bacteroides vulgatus</i>			?	?	↑ ^o	196
<i>Propionibacterium acnes</i>		Actinobacteria	↑	↑	?	202
<i>Escherichia Coli</i>		Proteobacteria	↑ ^d	↑ ^d	↑ ^d	19; 201

Tableau 1: Qualité de la dysbiose dans la NAFLD, la NASH et la fibrose (3/3)

↑↓= résultats discordants ; ? : non étudié ; d : retrouvé dans le DT2 ; o : retrouvé dans l'obésité

3. Rôle des métabolites bactériens

Les métabolites issus du métabolisme bactérien interagissent pleinement avec l'hôte pour maintenir l'homéostasie et toute dysbiose modifie le panel des métabolites produits et influe donc sur le développement de la pathologie. Les métabolites bactériens revêtent ainsi une importance primaire dans la compréhension des mécanismes de la NAFLD et de la NASH.

a. SCFAs

Les SCFAs sont issus de la fermentation des fibres alimentaires et ont des rôles fonctionnels clés dans la physiopathologie de l'obésité et des pathologies associées comme la NAFLD. Ils représentent une source d'énergie pour l'hôte et participent à la synthèse de lipides et de glucose *de novo* soit directement soit en activant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G (GPR) dont les GPR41 et GPR43²⁰⁷. Le butyrate lie spécifiquement GRP41, l'acétate GRP43 et le propionate se lie aux deux récepteurs²⁰⁸. GRP41 est localisé dans l'intestin et le système nerveux sympathique tandis que GRP43 est présent dans l'intestin, le tissu adipeux et dans les tissus immuns.

Parmi les trois SCFAs principaux, le butyrate est principalement utilisé comme substrat énergétique par les colonocytes ; le propionate est absorbé par l'intestin et métabolisé par le foie et l'acétate est libéré dans la circulation sanguine²⁰⁹.

Les SCFAs ont des fonctions diverses dans la régulation de l'homéostasie énergétique de l'hôte. Une de leur action d'intérêt réside dans le remodelage et le brunissement du TA.

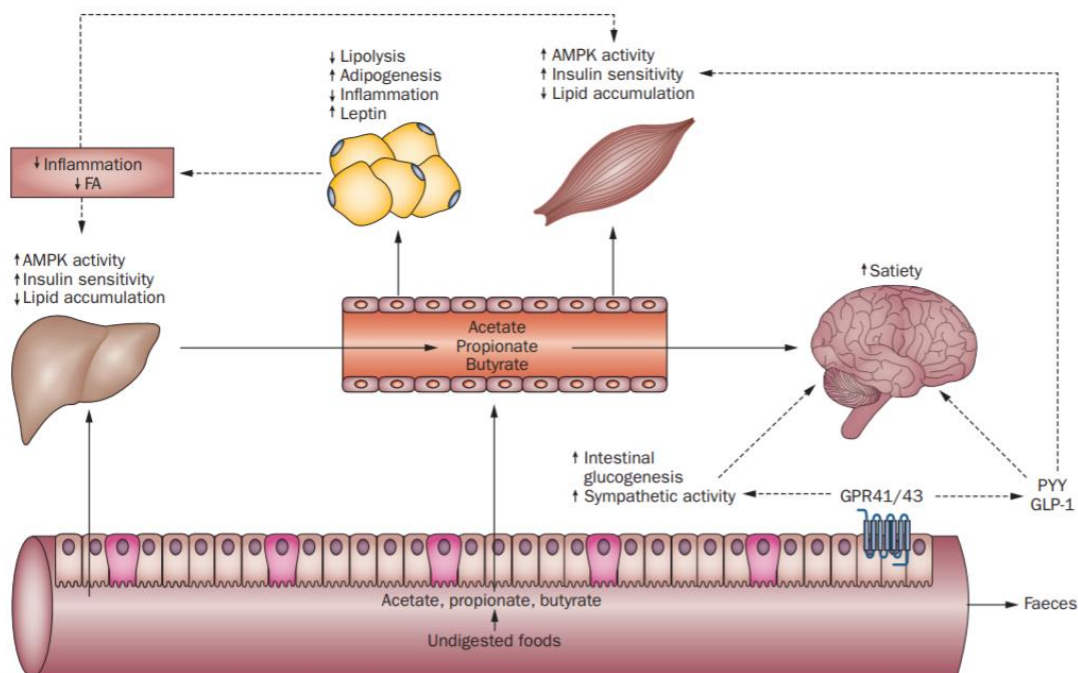


Figure 46: Mécanismes croisés des acides gras à chaîne courte dans la régulation de l'homéostasie métabolique; d'après Canfora et al., 2015²²⁶

Les SCFAs sont issus de la fermentation des fibres alimentaires par le MI. L'acétate, le propionate et le butyrate sont quantitativement les SCFAs les plus produits et agissent sur le foie, les tissus adipeux, le muscle et le cerveau et régulent le métabolisme énergétique de l'organisme entre autres via leur liaison aux GPR41 et GPR43

➤ Acétate

L'acétate est l'acide gras à chaîne courte le plus retrouvé dans la circulation plasmatique ce qui lui confère une plus grande capacité à exercer ses effets métaboliques dans les tissus périphériques. S'il est considéré comme substrat de la lipogenèse *de novo* et pourrait favoriser l'accumulation de TG dans le foie via cette voie, il est également associé à des bénéfices dans les pathologies métaboliques. L'acétate est en effet un des SCFAs majoritairement impliqué dans le brunissement du TA. Son mécanisme d'action par rapport au TA reste conflictuel. D'un côté, des études ont montré que l'administration de propionate et d'acétate inhibait la lipolyse^{210, 211}, d'un autre côté, d'autres études ont montré que l'acétate diminuait l'accumulation de lipides soit par modification de leur oxydation, soit par modification de leur synthèse et de l'activité de l'AMPK.²¹²⁻²¹⁴ L'acétate agit sur le métabolisme au niveau central et périphérique ce qui pourraient expliquer en partie les différences observées.

Sahuri-Arisoylu et al. ont utilisé des nanoparticules d'acétate sur des souris HFD pour investiguer son rôle périphérique dans le métabolisme énergétique en s'abrogeant de son

action centrale²⁰⁹. L'administration de particules d'acétate entraîne une amélioration phénotypique sans réduction de l'apport calorique ni diminution du poids. D'autres études témoignent d'une diminution de la prise de poids mais dans ce cas l'administration de l'acétate se fait par voie orale ce qui entraîne d'une part une action centrale avec régulation de la satiété, d'autre part une action périphérique.^{213, 214} Administré directement au sein des tissus cibles, l'acétate induit une diminution de la lipolyse du TA se traduisant par une diminution de l'ATGL (adipose triglycérade lipase) catalysant les TG en AGs libres et glycérol. Cette diminution de la lipolyse s'accompagne d'une diminution du taux d'AGs circulants et donc une diminution de l'exposition du foie à ces acides gras qui restent la source majeure de synthèse de TG. En parallèle, l'administration d'acétate s'accompagne d'une diminution de l'insulinémie ce qui entraîne d'une part une diminution de SREBP1c puis d'ACC et de FASN soit une diminution de la lipogenèse *de novo*, d'autre part une diminution de l'absorption du glucose par GLUT2 qui empêche également la DNL. L'action périphérique de l'acétate permet une diminution de la synthèse de TG que ce soit par voie endogène (diminution de la DNL) et par voie exogène (diminution du taux d'AG circulants). Ces effets sont corrélés à un brunissement du TA qui se traduit par une élévation d'UCP1, PRDM16 et PGC1 α aboutissant à la thermogenèse.

➤ Propionate

Le propionate est produit dans le côlon et va être rapidement absorbé. 90% du propionate est métabolisé par le foie et le reste est transporté dans l'organisme via la circulation périphérique. Les concentrations systémiques en propionate ne sont pas négligeables et lui permettent d'interagir directement avec l'hôte²¹⁵.

L'action du propionate est multiple :

- Directement via la circulation sanguine,
- Après liaison à GRP41 et GRP43 ce qui stimule différentes voies de signalisation.

Le propionate agit sur le métabolisme des lipides. Les résultats d'études menées *in vitro* et *in vivo* montrent que le propionate est capable de diminuer la production et la quantité d'AG hépatiques et plasmatiques. En plus d'une diminution de la DNL, le propionate agit sur le TA où il inhiberait la lipolyse et favoriserait l'adipogenèse²¹⁵. Cette action sur l'adipogenèse passerait probablement par une action sur le GRP41²¹⁶. En favorisant l'adipogenèse et en

inhibant la lipolyse, il est probable que le propionate améliore la sensibilité à l'insuline des adipocytes. *In vitro*, l'administration de propionate est corrélée à une augmentation de l'expression des récepteurs GLUT4 au sein du TA²¹⁵. La diminution du taux d'AG plasmatiques couplée à l'effet anti-inflammatoire du propionate participe à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Il a également été montré qu'une infusion rectale de propionate permettait de modifier le métabolisme lipidique et de diminuer la prise de poids et l'expansion du TA²¹⁷. Cela suggère que le propionate serait capable de renverser l'accumulation lipidique due à un régime HFD. Le propionate était capable de diminuer l'expression de PPAR γ et des gènes de la lipogénèse dont ACC. L'inhibition de PPAR γ entraîne la phosphorylation de l'AMPK qui a son tour phosphoryle l'ACC entraînant alors une diminution du taux de malonylCoA, inhibiteur de la CPT1. L'inhibition de PPAR γ annule donc la répression de CPT1 induite par un régime gras et favorise un shift du métabolisme lipidique qui passe de la synthèse des lipides à leur oxydation dans le foie et le TA.

Le propionate est également associé à la gluconeogenèse intestinale ayant un effet bénéfique sur le métabolisme du glucose et sur l'homéostasie énergétique²⁰⁸. Le propionate agit en tant que substrat direct de la gluconeogenèse intestinale via fixation sur GPR41 ce qui induit l'activation d'un axe « cerveau-intestin ». Le glucose produit au niveau de l'intestin est détecté par un capteur du glucose dans la veine porte et induit la transmission d'un signal au cerveau via le système nerveux périphérique et induit des effets bénéfiques sur la prise alimentaire et le métabolisme du glucose en diminuant notamment la production hépatique de glucose²¹⁸.

Le propionate présente de plus une action anti-inflammatoire et inhibe NF κ B en agissant via PPAR γ permettant la diminution des taux de LPS circulants et donc de l'inflammation systémique.

Enfin, le propionate induit la libération de PYY et de GLP1 par les cellules entéroendocrines via sa liaison aux GPR. PYY et GLP1 induisent un signal de satiété et réduisent l'apport alimentaire chez l'humain.

➤ Butyrate

Le butyrate est le substrat privilégié des colonocytes auxquels il fournit 60 à 70% de l'énergie dont ils ont besoin²¹⁹. En plus de cette activité, le butyrate pourrait avoir un rôle dans le brunissement du TA et l'activation du BAT et serait capable de restaurer la thermogénèse

altérée après déplétion du MI par traitement antibiotique. Une supplémentation en butyrate serait ainsi capable d'engendrer une activation du système nerveux sympathique permettant la stimulation du BAT et induisant alors la thermogénèse. En plus de cette action sur le TA, le butyrate semble empêcher le développement de la fibrose et donc le passage au stade NASH en activant l'AMPK dans le foie. L'AMPK inhibe le stress oxydant et l'inflammation et joue un rôle dans l'homéostasie énergétique via le métabolisme du glucose et des lipides. Par ailleurs, elle régule la biogénèse mitochondriale et diminue l'expression de gènes lipogéniques dont SREBP1c¹⁵⁷. Le butyrate joue alors un rôle protecteur et restreint l'accumulation hépatique de lipides et le développement de l'insulinorésistance.

Les SCFAs exercent donc une action croisée sur le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique les impliquant dans la modulation de la sensibilité à l'insuline²¹⁹.

Ainsi, dans le TA, GPR43 est fortement exprimé. Il a été démontré que l'acétate et le propionate agissent sur le TA en inhibant la lipolyse intracellulaire ce qui entraîne une diminution du flot d'AG libres dans la circulation sanguine. Les SCFAs agissent notamment en diminuant l'expression de PPAR γ . Dans le TA cela a été corrélé à une diminution des dépôts de graisses ectopiques et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline²⁰⁸. Enfin les SCFAs induiraient une diminution de la sécrétion des cytokines et chemokines pro-inflammatoires ce qui semble limiter l'infiltration locale des macrophages et donc une diminution de l'inflammation du TA.

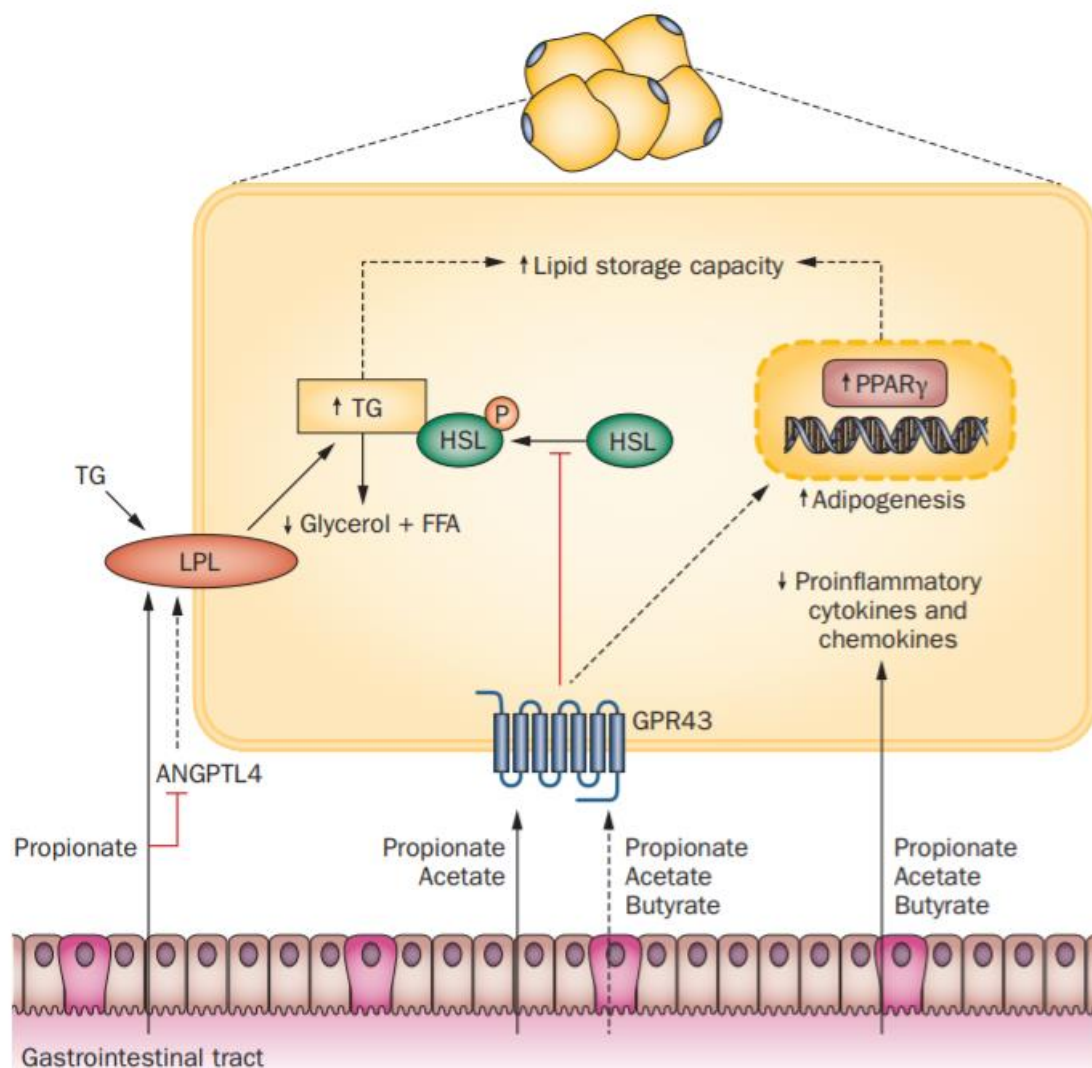


Figure 47: Impact des acides gras à courte chaîne dans le tissu adipeux, d'après Canfora et al., 2015²²⁶

Le propionate peut augmenter l'absorption des acides gras libres potentiellement via inhibition de l'ANGPTL4 inhibiteur de la LPL. Les SCFAs augmentent l'adipogenèse régulée par PPAR γ via leur fixation au GPR43. Ces effets pourraient contribuer au stockage des acides gras dans le foie et réduire leur libération dans la circulation sanguine. Les SCFAs pourraient également diminuer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et atténuer l'infiltration macrophagique.

Les traits pleins correspondent aux données retrouvées *in vitro* et *in vivo*. Les pointillés correspondent aux données contradictoires et à des hypothèses mécanistiques

ANGPTL4, angiotensin-like 4; FFA, free fatty acid; GPR43, G-protein coupled receptor 43; HSL, hormone sensitive lipase; LPL, lipoprotein lipase; P, phosphate; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; SCFA, short-chain fatty acid; TG, triglyceride.

Dans le muscle squelettique, l'acétate et le propionate permettraient de réduire les dépôts ectopiques de lipides en diminuant le flux d'AG libres. L'acétate et le butyrate induisent quant à eux l'oxydation des AGs en activant l'AMPK et en stimulant PPAR δ . Cela induit un turnover des lipides et impacte positivement la sensibilité à l'insuline. Ces deux SCFAs vont de plus influencer sur le métabolisme du glucose : en se fixant sur GPR41/43, ils induisent l'augmentation de son absorption par GLUT4 et les capacités de stockage du glucose sous

forme de glycogène. Enfin les SCFAs peuvent avoir une action indirecte sur la sensibilité insulinique du muscle et sur le métabolisme du glucose en induisant la sécrétion de PYY et GLP-1 par les cellules intestinales ²¹⁹.

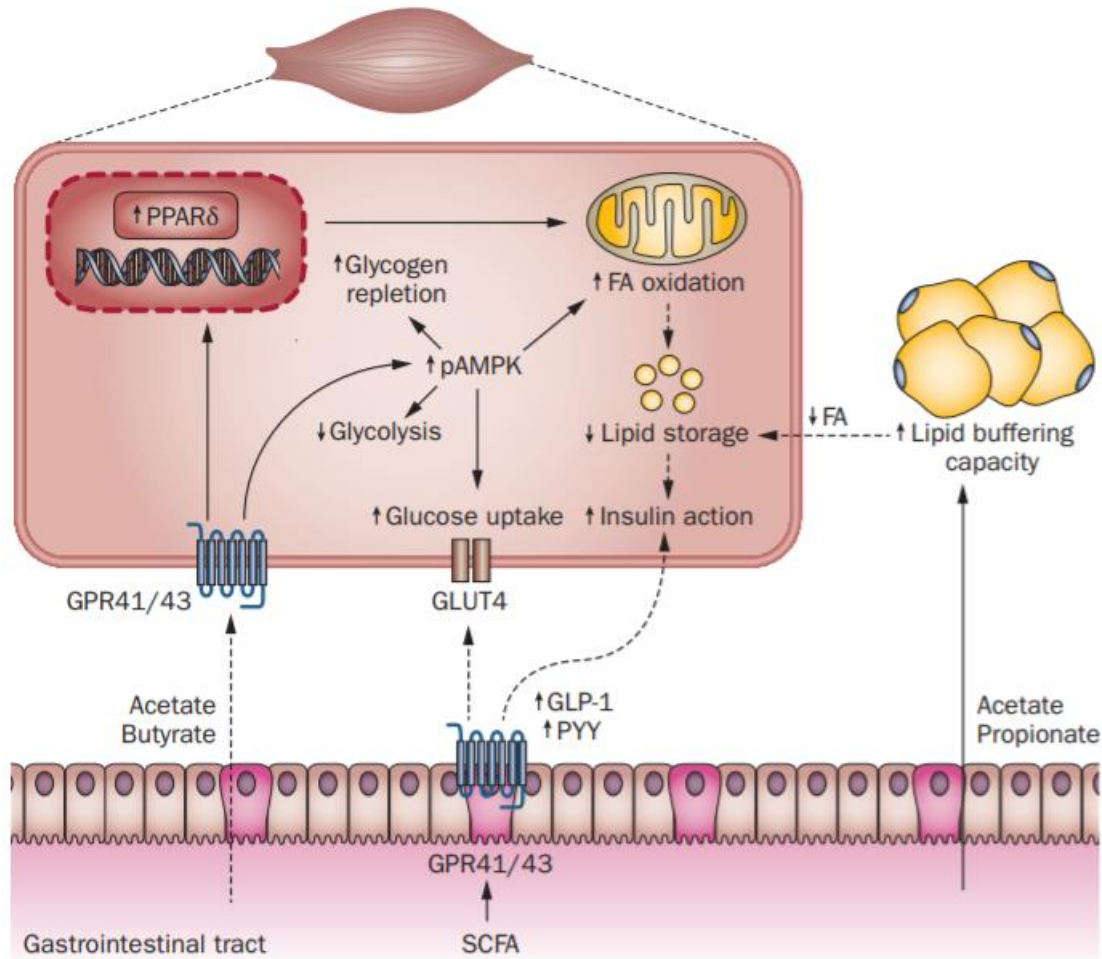


Figure 48: Action des acides gras à courte chaîne sur le métabolisme du muscle, d'après Canfora et al., 2015 ²²⁶

Dans le muscle squelettique, l'acétate et le propionate diminuent les dépôts ectopiques de lipides en diminuant l'apport exogène issu du tissu adipeux. L'acétate et le butyrate se lient au GPR41/43 et favorisent l'oxydation des AGs potentiellement via une augmentation de l'activité de l'AMPK et selon un mécanisme lié à PPAR δ . Ils peuvent également influencer le métabolisme du glucose en favorisant l'absorption de ce dernier et son stockage sous forme de glycogène. Enfin, les SCFAs peuvent également favoriser la réponse du muscle à l'insuline après sécrétion de GLP-1 et PYY.

Les traits pleins correspondent aux données retrouvées *in vitro* et *in vivo*. Les pointillés correspondent aux données contradictoires et à des hypothèses mécanistiques.

AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; FA, fatty acid; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GLUT4, glucose transporter type 4; GPR, G-protein coupled receptor; pAMPK, phosphorylated AMPK; PPAR δ , peroxisome proliferator-activated receptor δ ; PYY, peptide YY; SCFA, short-chain fatty acid

L'impact des SCFAs dans la régulation de l'homéostasie énergétique reste ambigu. D'une part les études chez l'animal suggèrent que les SCFAs seraient impliqués dans une augmentation de l'extraction énergétique et donc contribueraient au développement de l'obésité. Dans le foie, l'acétate et le butyrate peuvent agir directement en tant que substrats

de la lipogenèse tandis que le propionate agit lui en tant que substrat de la gluconeogenèse. Ainsi, au niveau intestinal, l'activation des récepteurs GRP41 et GRP43 induit une augmentation de la sécrétion de PYY, une diminution de la motilité intestinale et du temps de transit et par conséquent une augmentation de l'absorption de nutriments et de l'extraction d'énergie à partir du bol alimentaire. Cette interaction avec les récepteurs aux protéines G semble contribuer au développement de la NAFLD^{157, 220, 221}. A l'inverse, les SCFAs induiraient une augmentation de la dépense énergétique, stimuleraient la production d'hormones de la satiété et via l'acétate favoriseraient la régulation de l'appétit au niveau central ce qui aurait donc un impact bénéfique sur l'obésité. De plus les SCFAs et le MI les produisant sont associés à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et à une amélioration des pathologies métaboliques et de nombreuses études mentionnées précédemment montrent leurs rôles de régulateurs de l'homéostasie lipidique et glucidique via notamment le brunissement du tissu adipeux blanc. L'acétate et le butyrate peuvent réguler le métabolisme hépatique via l'AMPK²²². Ensemble, ces différents effets pourraient contribuer à l'amélioration de la sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline et au maintien de l'homéostasie énergétique.²¹⁹

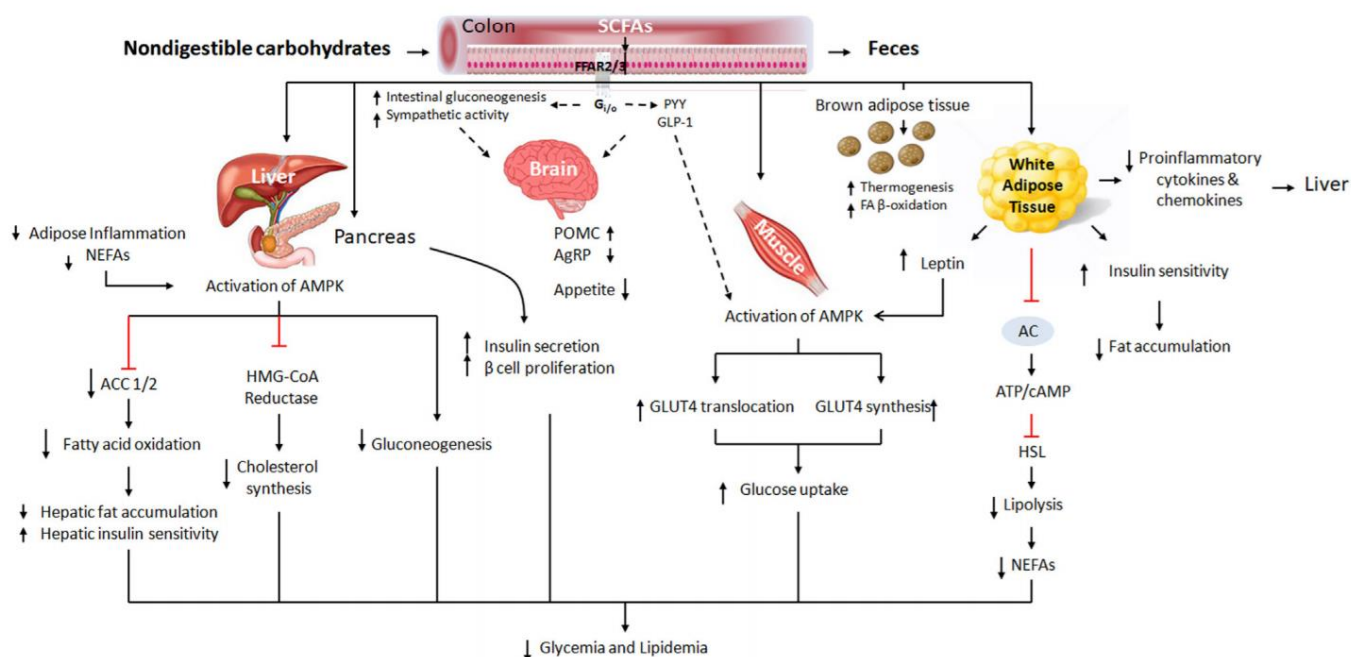


Figure 49: Les acides gras à chaîne courte régulent le métabolisme des lipides et du glucose via des réactions croisées inter-organes à travers l'activation de l'AMPK dans le foie et dans le muscle; d'après Tungland et al., 2018²²⁷

Les SCFAs agissent sur les différents organes pour réguler la glycémie et la lipidémie. La diminution de l'inflammation du tissu adipeux entraîne une diminution du flux d'AGs libres arrivant au foie et stimule l'activation de l'AMPK hépatique permettant une diminution de la stéatose hépatique, une diminution de la synthèse de cholestérol et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Dans le muscle squelettique, l'activation de l'AMPK favorise l'absorption du glucose par les récepteurs GLUT-4. Les SCFAs favorisent également la thermogénèse et la β -oxydation du BAT. L'ensemble de ces réactions entraîne une diminution de la glycémie et de la lipidémie.

NEFAs -non-esterified free fatty acids; HMG-CoA -hydroxymethylglutaryl CoA; GLUT 4 -glucose transporter 4, AMPK -adenosine monophosphate-activated protein kinase; HSL -hormone sensitive lipase; AC -adenylate cyclase; PYY-peptid YY; GLP-1

L'étude de Den Besten sur l'administration des différents SCFAs à des souris sous régime gras (HFD) témoigne d'une amélioration de l'obésité, de l'IR et de la stéatose hépatique indépendamment de la nature du SCFA administré²⁰⁸. Cette amélioration passe par une action sur les PPAR γ hépatiques et adipocytaires indépendantes : dans le foie, la diminution d'expression de PPAR γ étant associée à une réduction de la stéatose tandis que dans le TA l'action sur PPAR γ entraîne une amélioration de l'obésité et de l'IR.

Par ailleurs, les SCFAs pourraient limiter le passage d'un état NAFLD à un état NASH en agissant au niveau épigénétique via régulation des histone deacetylases (HDACs) ce qui favorise l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse anti-inflammatoire.

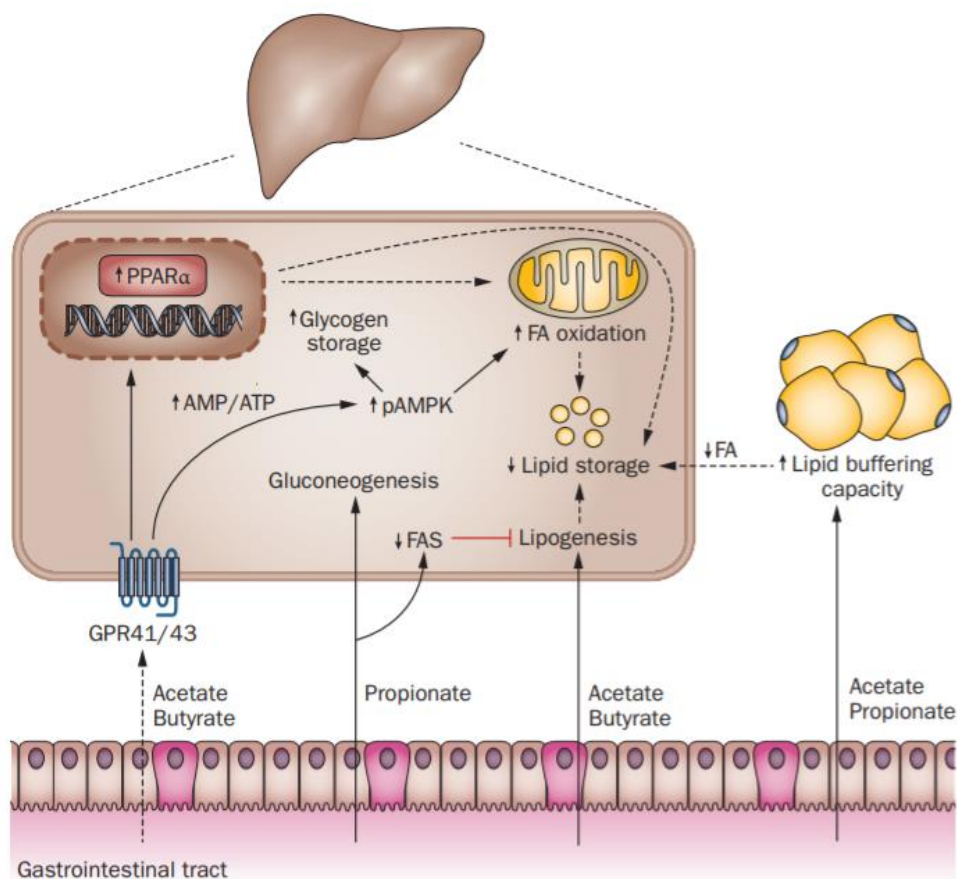


Figure 50: Rôle des SCFAs dans le métabolisme hépatique d'après Canfora et al., 2015²²⁶

Les SCFAs peuvent agir comme substrat de la gluconéogenèse et de la DNL dans le foie. Le propionate est un précurseur hépatique de la gluconéogenèse et atténue la lipogénèse en inhibant l'expression de FAS. L'acétate et le butyrate sont eux impliqués dans la lipogénèse hépatique et pourraient augmenter la phosphorylation de l'AMPK favorisant alors l'oxydation des AGs et une régulation positive de PPAR α et de ses gènes cibles.

Les traits pleins correspondent aux données retrouvées in vitro et in vivo. Les pointillés correspondent aux données contradictoires et à des hypothèses mécanistiques.

AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; GPR, G-protein coupled receptor; pAMPK, phosphorylated AMPK; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; SCFA, short-chain fatty acid

L'implication des SCFAs dans la NAFLD et dans la NASH reste à explorer et leur rôle apparait comme double, tantôt lié à une protection dans l'évolution de la pathologie et tantôt au contraire lié à une action délétère pour le foie. Des études chez l'homme ont montré un enrichissement en acétate et en formate chez les patients NASH tandis que les patients avec une NAFLD légère ou modérée présentaient plus une augmentation de butyrate et de propionate ¹⁵⁷. Au contraire, les études menées sur l'effet d'une supplémentation en SCFAs tendent à démontrer une action systémique majoritairement bénéfique de ces composés ²²³. Ainsi l'administration de Tributyrine, prodrogue du butyrate, à des souris sous régimes gras les protègent de l'obésité et prévient la stéatose hépatique et l'insulino-résistance. De même, l'administration de propionate et d'acétate, utilisés pour lutter contre la prise de poids associée à un régime gras, empêche l'accumulation de lipides dans le foie ainsi que l'IR. Cela passe par une réduction de l'absorption hépatique des AGs et la suppression de la lipogenèse dans le foie ¹⁵⁷.

Les preuves du potentiel thérapeutique des SCFAs comme outil métabolique dans la prévention et le traitement de la NAFLD ne cessent d'augmenter. Si les SCFAs sont majoritairement considérés comme bénéfiques pour la santé de l'hôte, des études poussées restent nécessaires. En effet, la plupart des données dérivent d'études chez l'animal ou *in vitro* et la relevance clinique chez l'homme ainsi que l'impact métabolique réel restent à établir. De plus l'existence d'autres GPR que GPR41 et GPR43 nécessitent de clarifier les potentiels effets secondaires liés à une action des SCFAs sur ces récepteurs.

REVUE DE LITTÉRATURE : Impact du microbiote intestinal dans la NAFLD/NASH

		ACETATE	BUTYRATE	PROPIONATE
	Liaison GPR41	-	+	+
	Liaison GPR43	+	-	+
	Substrat DNL	+	+	-
	Substrat Gluconeogenèse	-	-	+
	Sécrétion GLP-1	+	+	+
	Sécrétion PYY	+	+	+
	Extraction énergétique	+	++	+
FOIE	Activité AMPK	↗	↗	NA
	Sensibilité à l'insuline	↗	↗	↗
	Absorption du glucose	↘	NA	NA
	Accumulation de lipides	↘	↘	↘
	Lipogenèse <i>de novo</i>	↘	↘	↘
	Neoglucogenèse	NA	NA	↗
	Stockage du glycogène	↗	↗	NA
	Activité PPAR α	↗	↗	NA
	Oxydation Acs	↗	↗	↗
TA	Lipolyse	↘	↘	↘
	Adipogenèse	↗	↗	↗
	Inflammation	↘	↘	↘
	Sécrétion Leptine	↗	↗	↗
	Activité PPAR γ	H	H	H
	Augmentation de l'absorption des AGs	NA	NA	H
	Diminution de la phosphorylation d'HSL	H	NA	H
Brunissement TA	↗	↗	↗	
MUSCLE	Activité AMPK	↗	↗	↗
	Sensibilité à l'insuline	↗	↗	↗
	Accumulation de lipides	↘	↘	↘
	Activité PPAR δ	↗	↗	NA
	Glycolyse	↘	↘	NA
	Oxydation Acs	↗	↗	↗
	Augmentation de l'absorption du glucose	↗	↗	↗
BAT	Thermogenèse	↗	↗	↗

Tableau 2: Fonctions des acides gras à chaîne courte dans la NAFLD

NA : manque d'information; H : rôle probable considéré comme une hypothèse

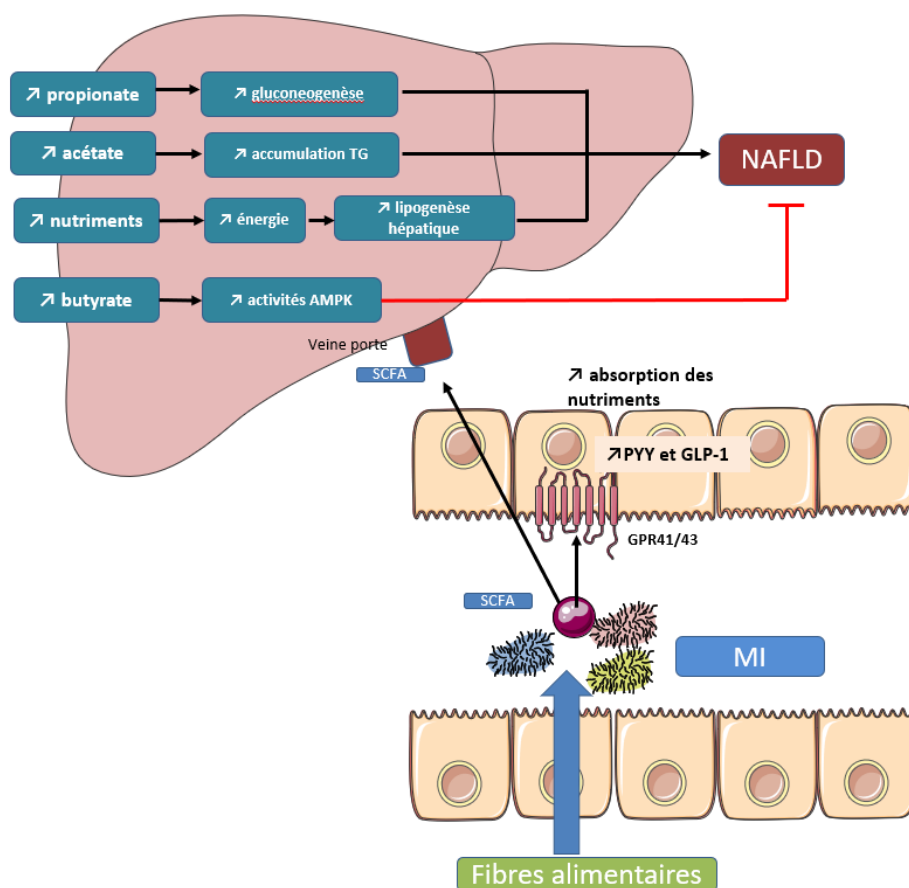


Figure 51: Acides gras à chaîne courte et NAFLD, d'après Chu et al., 2018¹⁸⁴

Les SCFAs sont générés par le MI après fermentation des fibres alimentaires et entrent dans le foie via la veine porte. Dans le foie, l'acétate et le propionate favorisent l'accumulation de TG et la synthèse hépatique de glucose.

Les SCFAs activent également GPR41 et GPR43 dans les cellules intestinales ce qui entraîne la sécrétion de PYY et de GLP-1, et favorise l'absorption de nutriments. L'augmentation de l'absorption énergétique contribue à la DNL.

D'un autre côté le butyrate peut activer l'AMPK et atténuer la stéatose hépatique.

b. Acides biliaires

Comme décrit précédemment, le MI est un acteur majeur indispensable du métabolisme des acides biliaires. Son action affecte la taille et la composition du pool d'acides biliaires. Ainsi, une dysbiose altère les concentrations systémiques en acides biliaires primaires et secondaires et modifie leur synthèse²²⁰. Compte tenu du rôle des acides biliaires dans la régulation du métabolisme, via TGR5 mais surtout FXR, la modulation de la composition du pool d'acides biliaires en cas de dysbiose impacte l'homéostasie métabolique.

Une augmentation du pool d'acides biliaires induit l'activation de voies de signalisation associées à la mort cellulaire et impliquant des cascades de réactions oxydatives et inflammatoires hépatiques. Une diminution du taux d'acides biliaires secondaires par le MI lors de la dysbiose amoindrit quant à elle la stimulation de FXR et TGR5 dans l'iléon. Cela

engendre une rétention des sels biliaires, une augmentation de la perméabilité intestinale et une surcroissance bactérienne favorisant le développement de maladies hépatiques²²⁴.

Les patients NASH présentent une modification de la composition de leur pool d'acides biliaires avec une augmentation du ratio acides biliaires primaires/acides biliaires secondaires fécaux ²²⁴. De plus, on retrouve une augmentation de l'acide chénodeoxycholique (CDCA, acide biliaire primaire) et une diminution des taux d'acides deoxycholique (DCA) et ursodeoxycholique (UDCA) (acides biliaires secondaires) dans le sérum de patients NASH ²²⁵.

L'ensemble de ces données montre l'implication certaine de la dysbiose dans la composition du pool d'acides biliaires et l'impact que ce changement peut entraîner dans le développement et la progression de la NAFLD. En dépit des données contradictoire sur l'action bénéfique ou délétère de FXR dans la NAFLD, les agonistes des récepteurs FXR et TGR5 sont étudiés comme piste thérapeutique dans les hépatopathies^{158, 220, 224 226}. Chez l'homme, les études FLINT et REGENERATE analysent le potentiel de l'acide obéticholique (OCA), agoniste de FXR dans le traitement de la NASH²²⁷. Si l'amélioration de la stéatose hépatique et de la fibrose a été démontrée pour cette molécule, les effets indésirables notamment le potentiel athérogénique de l'OCA et l'apparition d'un prurit sont à noter. D'un autre côté, le fait que les activateurs de TGR5 puisse induire une prolifération cholangiocytaire a largement mis un frein à la recherche d'agoniste spécifique TGR5 ²²⁸.

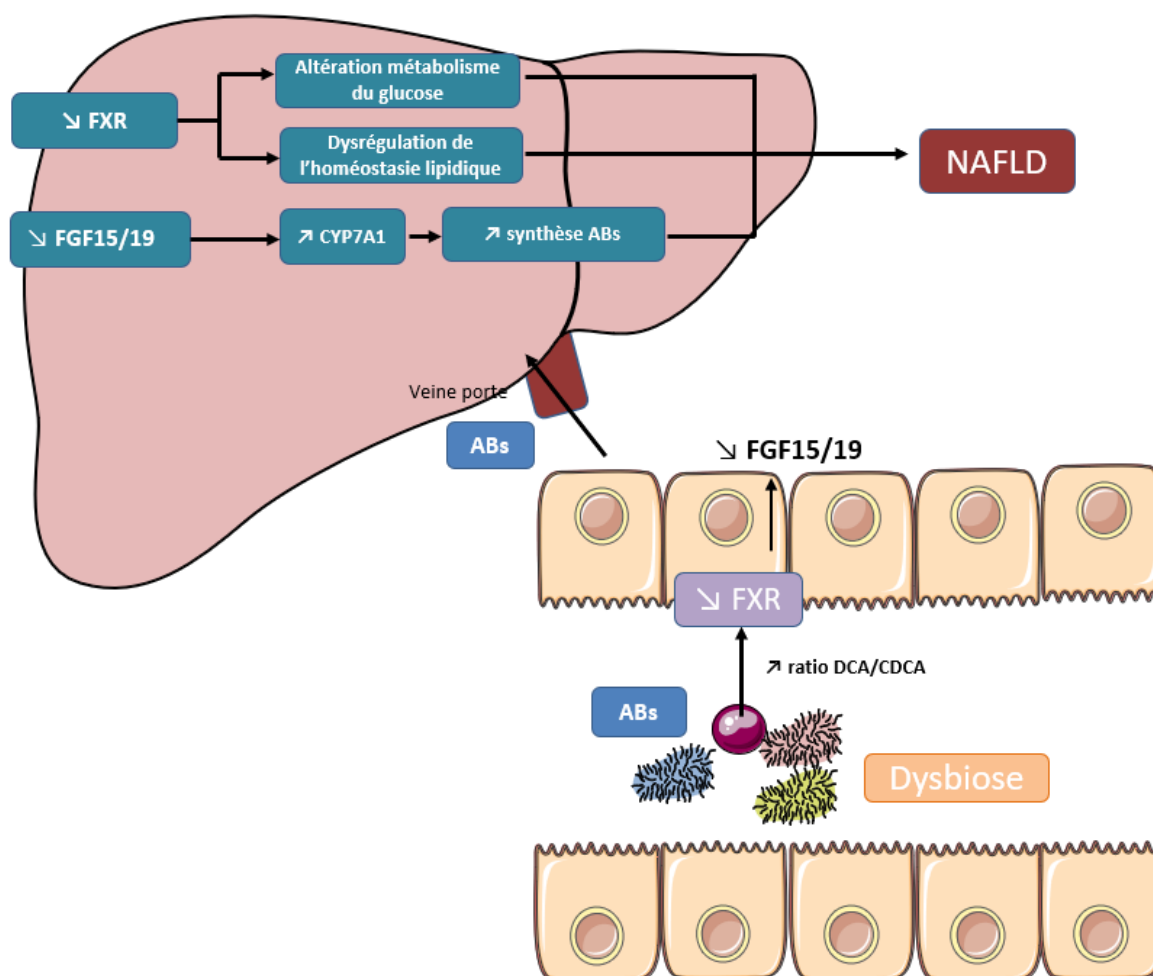


Figure 52: Implication des acides biliaires dans la NAFLD, d'après Chu et al., 2018¹⁸⁴

La dysbiose du MI modifie la composition des ABs. L'augmentation du ratio DCA/CDCA diminue l'activation de FXR et l'expression de FGF15/19.

La diminution de FXR altère le métabolisme du glucose et l'homéostasie lipidique.

La diminution de FGF15/19 augmente l'expression de CYP7A1 et par conséquent la synthèse d'ABs.

Cela participe au développement de la NAFLD.

c. Métabolisme de la choline

La choline est un élément indispensable pour la production des VLDL et participe au transfert de lipides dans le foie. Elle a deux origines distinctes : 70% de l'apport en choline provient de l'alimentation et le reste est synthétisé par l'organisme. Dans le foie, la choline est principalement utilisée pour la biogenèse de la phosphatidylcholine ou dans le maintien du cycle de la S-adenosyl methionine (SAME). Une délétion des gènes impliqués dans le métabolisme de la choline et le manque de disponibilité en choline pour le cycle de SAME promeut le développement de la NAFLD. Une déficience en choline est régulièrement utilisée dans les modèles animaux pour recréer une NAFLD. Un déficit en choline induit en effet une diminution des taux de VLDL par manque de phosphatidylcholine et inhibition de la β -

oxydation ce qui entraîne l'accumulation hépatique de lipides et de cholestérol, la genèse d'un stress oxydant et une altération des cytokines et adipokines favorisant un contexte inflammatoire^{177 159}.

Le taux de choline disponible dans l'organisme dépend d'une part de la qualité de l'alimentation, d'autre part du métabolisme du MI¹⁸⁶. En effet certaines bactéries commensales comme *E.Coli* ou *Desulfovibrio desulfuricans* convertissent la choline en méthylamines telles que la triméthylamine (TMA) ou la diméthylamine (DMA). Un des dérivés du TMA est le TMAO qui provient de l'oxydation hépatique du TMA. Le TMAO peut participer au développement de la NAFLD via divers mécanismes. Le TMAO module le métabolisme du glucose, promeut le développement de l'insulinorésistance et favorise l'inflammation du tissu adipeux. De plus, le TMAO impacte la conversion du cholestérol en acides biliaires affectant alors l'absorption des lipides et l'homéostasie du cholestérol¹⁵⁷. Enfin le TMAO apparaît comme facteur aggravant de plusieurs pathologies métaboliques comme l'athérosclérose, le diabète de type II et de certaines maladies cardiovasculaires. La dysbiose intestinale impliquée dans la NAFLD peut conduire à une biotransformation de la choline en TMA ce qui induit une augmentation de la synthèse de TMAO et une diminution des quantités de choline disponibles²²⁹. Certaines espèces bactériennes peuvent également utiliser la choline pour la synthèse de phosphatidylcholine, composant de la membrane cellulaire des eucaryotes mais aussi de 10 à 15% des espèces bactériennes dont *L. pneumophila* et *P. aeruginosa*. Lors de la NAFLD, une surcroissance bactérienne dans l'intestin peut être à l'origine d'une augmentation de l'utilisation de la choline par ces bactéries pour produire de la phosphatidylcholine et donc participer à la déplétion des stocks disponibles en choline ce qui favorise à terme le développement de la NAFLD et la progression en NASH¹⁵⁹.

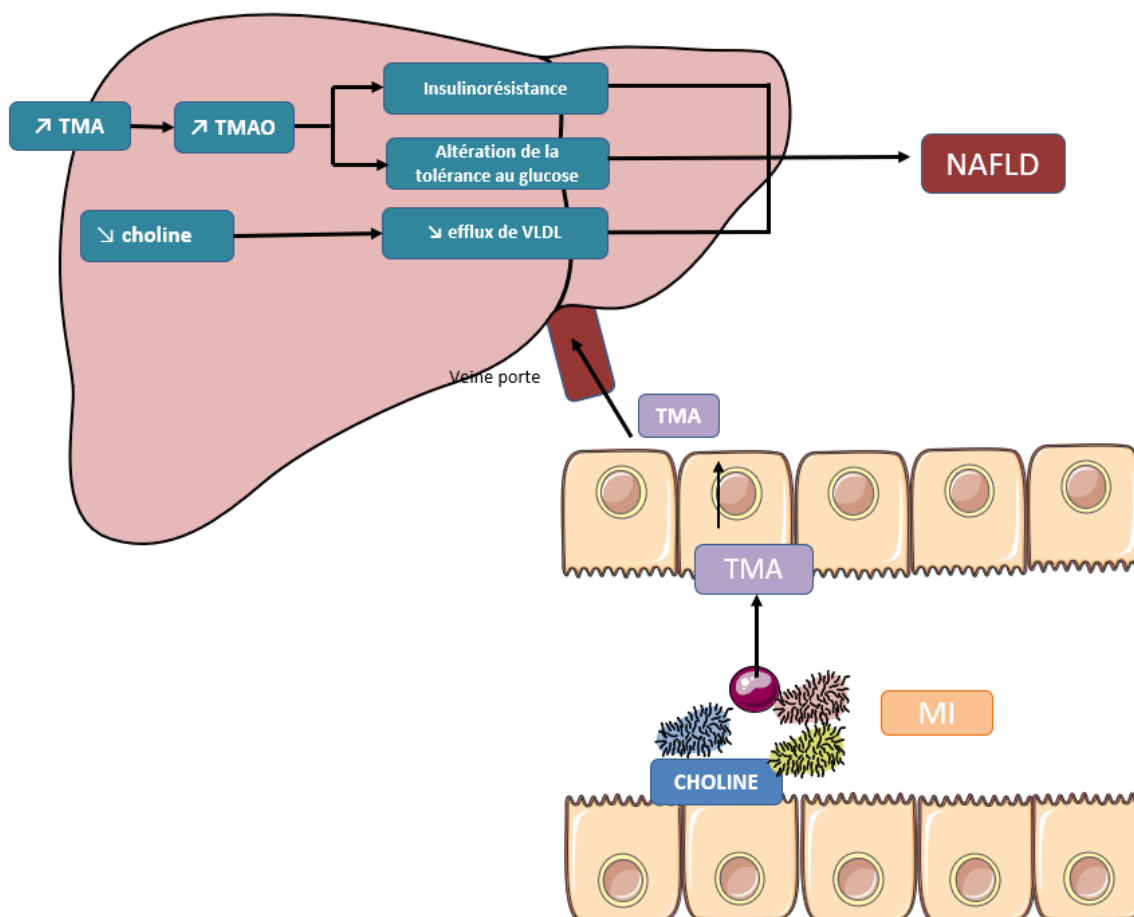


Figure 53: Implication de la choline et de ses métabolites dans la NAFLD; d'après Chu et al., 2018¹⁸⁴

La choline est convertie en TMA par le MI ce qui diminue le pool disponible de choline. Une diminution de la choline impacte la sécrétion des VLDL et favorise l'inflammation du foie. Des taux élevés de TMA induisent la production de TMAO et favorisent le développement de la NAFLD par une augmentation de l'insulinorésistance et une diminution de la tolérance au glucose

d. Production endogène d'éthanol

Des études cliniques ont fait part de la détection de taux bas d'éthanol plasmatique notamment chez les patients pédiatriques présentant une NASH¹⁹⁴. Certaines espèces bactériennes portent des gènes capables de produire de l'alcool après fermentation de sucres issus de l'alimentation. La production d'alcool endogène participe au développement et à la progression de la NAFLD. En effet, la stéato-hépatite alcoolique et la NASH partagent un certain nombre de caractéristiques communes au niveau histologique. La consommation d'éthanol favorise la perméabilité de la barrière intestinale en augmentant l'expression intestinale de cytokines pro-inflammatoires. Un des métabolites de l'éthanol, l'acétaldéhyde, affecte quant à lui les protéines de jonctions serrées. L'éthanol exacerbe le stress oxydant et l'inflammation hépatique. Dans le foie, l'éthanol inhibe le cycle de l'acide tricarboxylique ce qui entraîne une augmentation des taux d'acétate et favorise l'accumulation de triglycérides

hépatocytaires. L'alcool augmente également l'activité du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) induisant une oxydation de l'alcool et la production de ROS impliqués dans l'inflammation du foie²³⁰. Une étude récente a notamment isolé une souche de *Klebsiella pneumoniae* capable d'induire une production significative d'alcool endogène. La détection de cette bactérie dans une cohorte de patients chinois NAFLD et NASH était associée avec la sévérité de la pathologie et portée par près de 60% des patients de la cohorte. Le transfert par gavage de cette bactérie chez des souris induisait le développement de la NAFLD²³¹. La dysbiose intestinale dans la NAFLD peut donc contribuer à la production d'alcool endogène qui conduit à la progression de la NAFLD en augmentant la perméabilité intestinale et, suite à la formation d'acétate et d'acétaldéhyde, promeut la fibrose hépatique^{157, 196}.

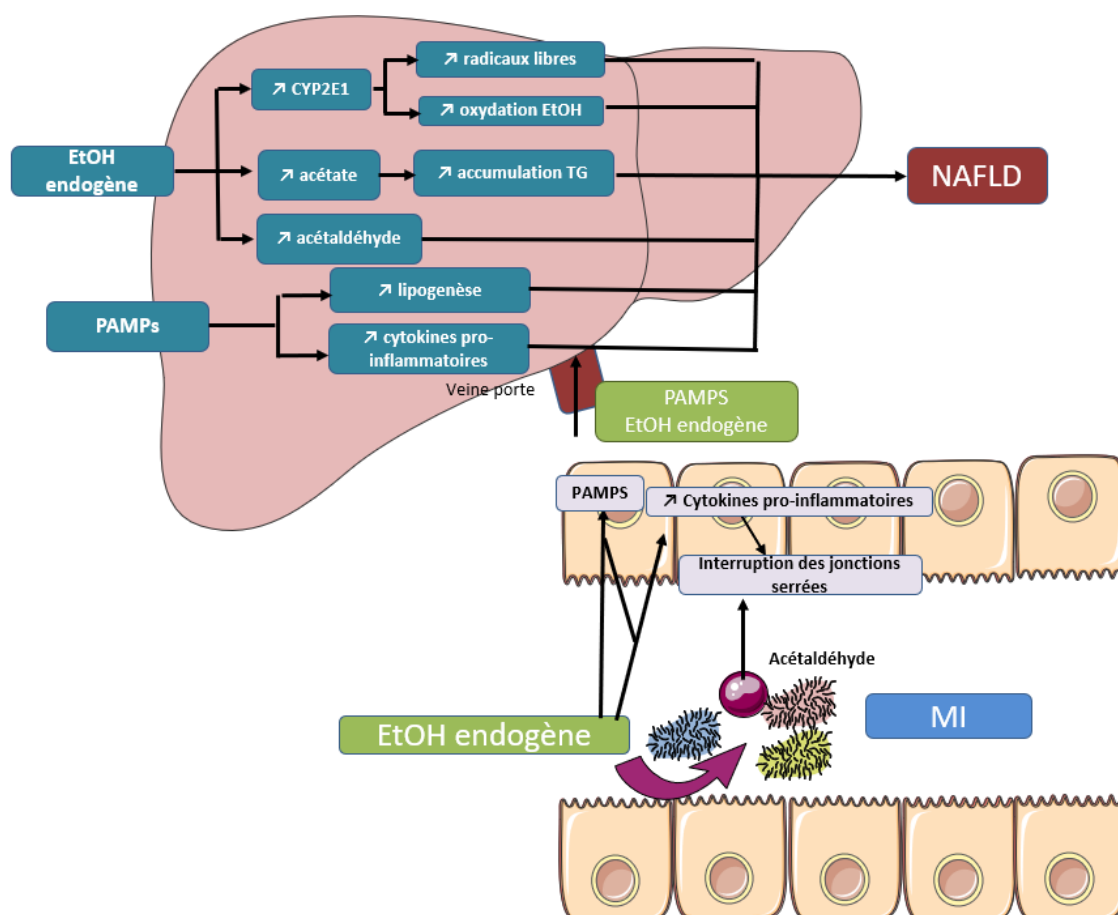


Figure 54: Implication de l'éthanol dans la NAFLD, d'après Chu et al., 2018¹⁸⁴

La production endogène d'éthanol entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale en activant la production de cytokines pro-inflammatoires et d'acétaldéhyde. Il y a translocation des PAMPs dans le foie ce qui accentue la production de cytokines pro-inflammatoires et active la lipogenèse. L'acétaldéhyde produit est cytotoxique pour les hépatocytes. L'acétate favorise quant à lui l'accumulation de TG dans le foie. Enfin l'éthanol endogène active CYP2E1 ce qui participe également au contexte inflammatoire.

Le MI dysbiotique via la production de métabolites bactériens et en particulier des SCFAs, de la choline, des acides biliaires et d'éthanol endogène participe activement au développement et à la progression de la NAFLD en NASH²³².

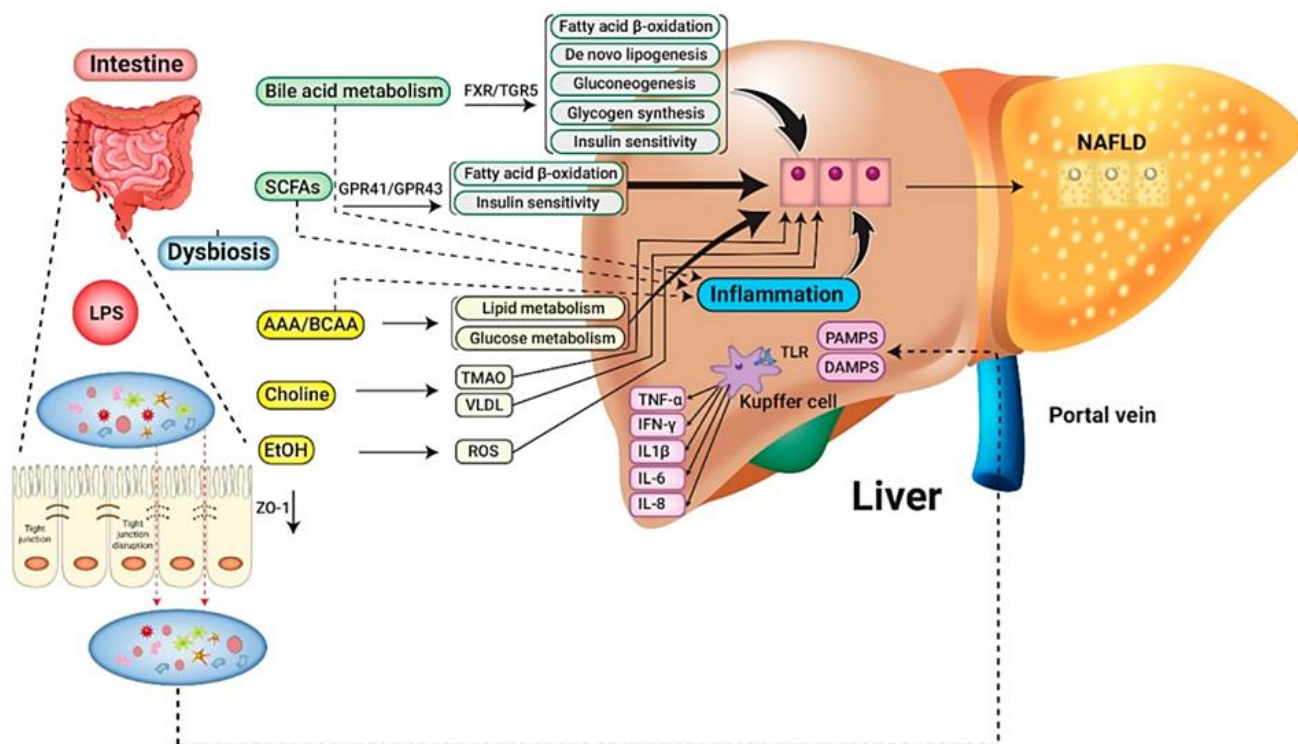


Figure 55: Rôles des métabolites bactériens dans le développement de la NAFLD et de la NASH, d'après Xie et al., 2019²³⁷

Le MI participe au développement de la NAFLD et de la NASH via différents mécanismes intriqués.

La dysbiose altère la perméabilité intestinale et favorise la translocation de composants comme le LPS et les PAMPs qui favorisent le développement de l'inflammation

Les métabolites bactériens (éthanol, choline, acides aminés, SCFAs et acides biliaires) régulent l'homéostasie lipidique et glucidique ainsi que des processus inflammatoires.

C. Interaction entre le microbiote intestinal et le tissu adipeux ; importance de l'axe tissu adipeux/intestin

Les premiers éléments témoignant d'une interaction entre le microbiote intestinal et le tissu adipeux que ce soit le BAT ou le TA découlent d'études menées chez des souris dépourvues de MI. En effet, chez des souris axéniques, il a été montré une diminution de l'extraction énergétique des nutriments apportés par l'alimentation et une augmentation de métabolites associés à l'activité du BAT ce qui oriente vers une suractivation du catabolisme lipidique du BAT chez ces souris. De plus, chez les souris conventionnelles, une déplétion du MI induite par un traitement antibiotique favorisait l'avènement d'un brunissement du TA au niveau de dépôts sous-cutanés et viscéraux avec une augmentation des marqueurs géniques

du BAT à savoir UCP1, Cidea, PGC1 α et PPAR α .^{233,234} Ces modifications s'accompagnaient d'une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline, ainsi que d'une réduction de la masse grasse corporelle de ces souris. La transplantation fécale opérée dans le but de restaurer la flore intestinale initiale des souris s'accompagnaient d'une altération de la tolérance au glucose, d'une augmentation des taux de tissu adipeux blanc et de la taille des adipocytes, ainsi que d'une atténuation de l'expression des gènes relatifs au brunissement du tissu adipeux. Ces résultats témoignent donc du lien entre le MI et les tissus adipeux.

Les mécanismes par lesquels le MI interagit avec le BAT et le tissu adipeux blanc commencent à être décryptés. Il semblerait qu'une déplétion du MI induise une diminution de sécrétion de LPS dans la circulation sanguine et une réduction de la stimulation de TLR4 par ce LPS. Par voie de conséquence, l'arrêt de ce processus diminuerait l'inflammation du TA et permettrait une activation du BAT s'accompagnant d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline²³⁵. Des études menées sur l'impact d'une exposition au froid sur la composition du MI montre qu'une transition importante s'opère lors de ce phénomène. De plus la transplantation du MI des souris exposées au froid induit une augmentation de la dépense énergétique et l'induction du brunissement des adipocytes²³⁶. De la même manière, l'exposition de rongeurs au froid entraînait une diminution de l'obésité associée à une activation du BAT et d'une modification de la composition du MI avec augmentation de *Adlercreutzia*, *Mogibacteriaceae*, *Ruminococcaceae*, *Desulfovibrio*; et diminution de l'abondance de *Bacilli* et *Erysipelotrichaceae*²³⁷. Dans cette étude, la transplantation fécale du MI des souris maintenues à 12°C à des souris receveuses axéniques sous régime enrichi en graisses induit une prise de poids moins importante et une activation du BAT avec augmentation de l'expression génique et protéique d'UCP1 par rapport aux souris recevant le MI de donneuses élevées à une température plus importante. De la même manière les souris exposées à un jeûne intermittent montrent elles aussi un brunissement du tissu adipeux et une modification du microbiote intestinal dont l'implication dans les modifications physiologiques décrites est confirmée par des études de transplantations fécales²³⁸. Une seule étude chez l'homme a analysé la relation entre le MI et le brunissement du tissu adipeux. Les résultats montrent qu'une abondance relative en Firmicutes est associée à une augmentation des marqueurs PRDM16 et UCP1 associés au brunissement du TA.

Certaines études observant l'impact d'une supplémentation en polyphénols tels que les gypénosides ou la glucoraphanine montrent que l'induction d'un brunissement du TA et l'activation du BAT sont également accompagnés d'une modification du MI. Ainsi une alimentation enrichie en polyphénols augmente notamment l'abondance en *Akkermansia muciniphila* et est associée à une amélioration du métabolisme gluco-lipidique en plus des modifications induites sur les tissu adipeux²³⁹.

Par ailleurs, au-delà des modifications propres de composition du MI, les produits bactériens comme les SCFAs pourraient également intervenir dans le brunissement et l'activation du tissu adipeux brun. Il a ainsi été prouvé qu'une supplémentation orale en butyrate et en acétate chez des souris sous régime enrichi en graisse permettaient de stimuler l'expression génique de PPAR α et UCP1 dans le BAT et le TA. De même, les souris soumises à un jeûne intermittent montraient une modification de la composition bactérienne corrélée à une augmentation de l'acétate et du lactate, produits de fermentation capables d'augmenter l'expression de MCT1 dans les adipocytes et de promouvoir le développement d'un brunissement du TA²⁴⁰. Une étude chez le rongeur a montré que l'administration de resvératrol, molécule anti-oxydante permettant de contrer les effets induits par un régime gras, entraînait une augmentation de *Bacteroidetes*, *Blautia*, *Ruminococcus*, et *Parabacteroides*, connues pour être des producteurs de SCFAs. Cette modification de composition de MI et les effets bénéfiques de la molécule s'accompagnaient d'un brunissement du TA²⁴¹.

D'autres métabolites comme les anthocyanines métabolisés également par le MI ont montré leurs effets anti-obésité et l'induction d'une modification d'activité du BAT et de l'expansion des adipocytes beiges au sein des tissus adipeux.²⁴²

Si les mécanismes précis restent peu connus quant à l'effet du BAT et du brunissement du TA sur le syndrome métabolique et la NAFLD, beaucoup d'éléments sont en faveur d'un axe tissu-adipeux/intestin jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. L'activation du BAT peut donc être un axe thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge de la NAFLD²³⁸. Chez le rongeur, les différents traitements sus-mentionnés sont administrés en préventif et leurs effets curatifs tant chez l'animal que chez l'humain restent à vérifier.

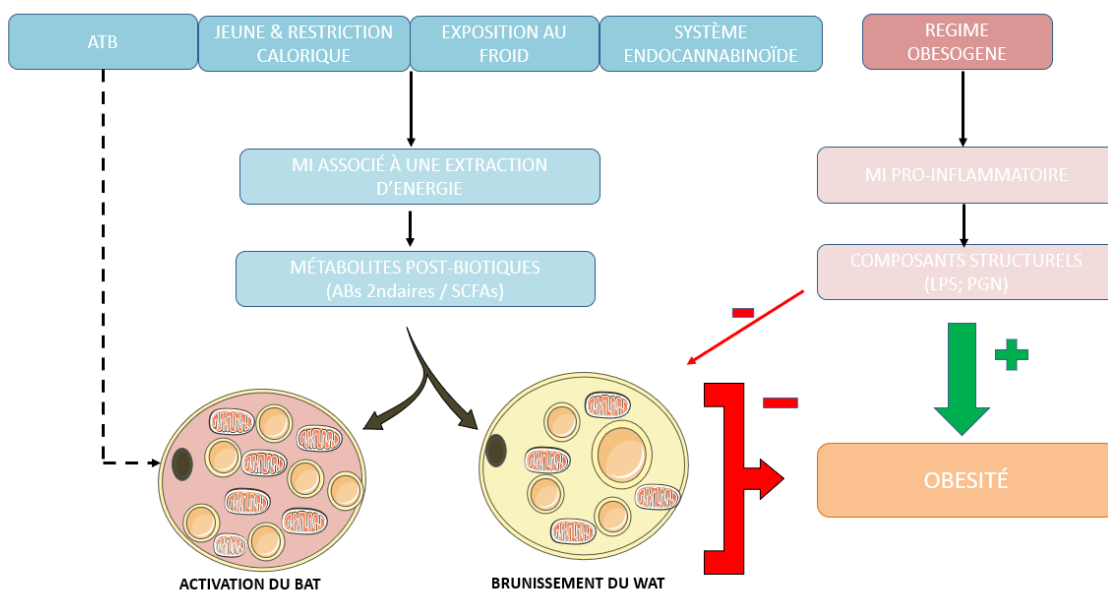


Figure 56: Rôle du brunissement du tissu adipeux blanc (WAT) et de l'activation du tissu adipeux brun (BAT) dans la NAFLD, d'après Moreno-Navarrete et al. , 2019³⁵⁶

Cette figure montre l'impact de certaines situations physiologiques de stress sur la composition et l'activité du MI. Les SCFAs et les ABs secondaires favorisent l'activation du BAT et le brunissement du WAT tandis que le LPS et les peptidoglycans stimulent la réponse inflammatoire du WAT et inhibent son brunissement.

D. Autres mécanismes

1. Implication de FIAF (fasting-induced adipose factor)

Le microbiote intestinal est capable de diminuer l'expression intestinale de FIAF aussi connu sous le nom d'angiopoïétin-like protein 4. FIAF est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase circulante (LPL) produit par l'intestin, le tissu adipeux et le foie. L'inhibition de FIAF induit des taux plus importants de LPL ce qui favorise l'absorption cellulaire des acides gras, l'accumulation de triglycérides et donc une majoration du stockage des graisses^{243, 244}.

2. Pullulation microbienne au niveau de l'intestin grêle (SIBO, small intestinal bacterial overgrowth)

La NAFLD et la NASH sont associées à une endotoxémie qui peut s'expliquer en partie par une pullulation microbienne dans l'intestin grêle (SIBO). Dans la NAFLD, une SIBO est retrouvée dans 50 à 70% des études et concerne 56% des patients NAFLD. Ce phénomène a été reconnu comme facteur indépendant de la sévérité de la stéatose hépatique en raison de son rôle dans le dysfonctionnement de la barrière intestinale. Aucune corrélation n'a été établie en revanche entre la SIBO et la présence d'une NASH, d'une inflammation lobulaire ou du score de fibrose.

En cas de SIBO, on assiste à une modification quantitative du microbiote qui induit une dysbiose. Cette dysbiose favorise l'augmentation de la perméabilité intestinale et la translocation de produits bactériens dans la circulation systémique avec les conséquences connues pour le développement et la progression de la NAFLD et de la NASH ^{178, 245}.

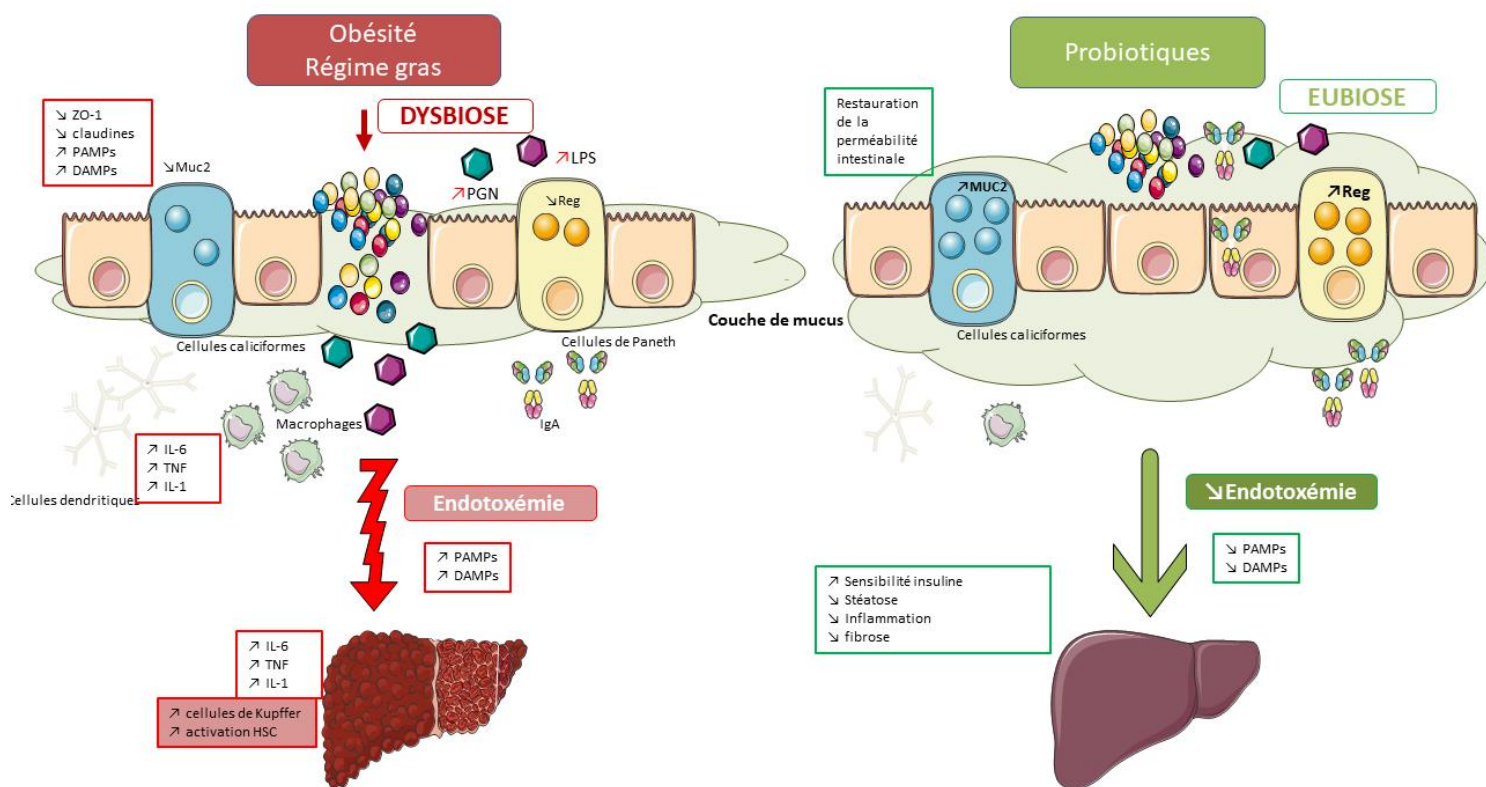


Figure 57: Impact de l'axe foie-intestin dans la pathogenèse de la NAFLD et potentiel thérapeutique des probiotiques d'après Meroni et al.; 2019 ³²¹

(A) L'obésité, un régime alimentaire délétère et la sédentarité favorisent la stéatose hépatique, altèrent la barrière intestinale et modifient la composition du microbiote intestinale créant une dysbiose. La perméabilité intestinale augmente avec perte de l'activité des protéines de jonctions serrées (ZO-1, claudines), la couche de mucus s'affaiblit (MUC2) et il y a diminution de sécrétion des peptides antimicrobiens et des IgA. Cela entraîne l'apparition d'un milieu pro-inflammatoire avec recrutement des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules T CD4+ et T CD8+. Il va y avoir translocation de bactéries pathogènes, de PAMPs et de DAMPs comme le LPS. En atteignant le foie via la veine porte les PAMPs/DAMPs et des taux importants d'acides gras libres circulants activent les cellules de Kupffer et induisent une réponse inflammatoire hépatocytaires qui active les cellules stellaires du foie via une cascade de réactions régulée par les TLR. On assiste à une augmentation de la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dont (TNF α , IL1, IL6, IL8 et IFN- γ) et une aggravation des lésions du foie.

(B) Les probiotiques peuvent induire la restauration de l'intégrité de la barrière intestinale et les paramètres perturbés par la dysbiose. Ils induisent la sécrétion d'acteurs anti-inflammatoires comme TGF- β et IL10 via les cellules de l'immunité. Dans le foie, la diminution de l'endotoxémie endigue les dommages hépatiques et contribue à la restauration des fonctions hépatiques. L'inflammation est maîtrisée et on retrouve une sensibilité à l'insuline, une diminution de la stéatose et une diminution de la fibrose.

L'ensemble des données actuelles indique que le MI est un cofacteur important dans le développement et la progression des lésions hépatiques de la NAFLD. Cependant, la grande complexité de cet écosystème ne permet pas encore aujourd'hui de dégager des voies

métaboliques ou d'espèces bactériennes spécifiquement impliquées dans les effets protecteurs ou inversement délétères. En effet, de par les effets pléiotropiques inhérents au

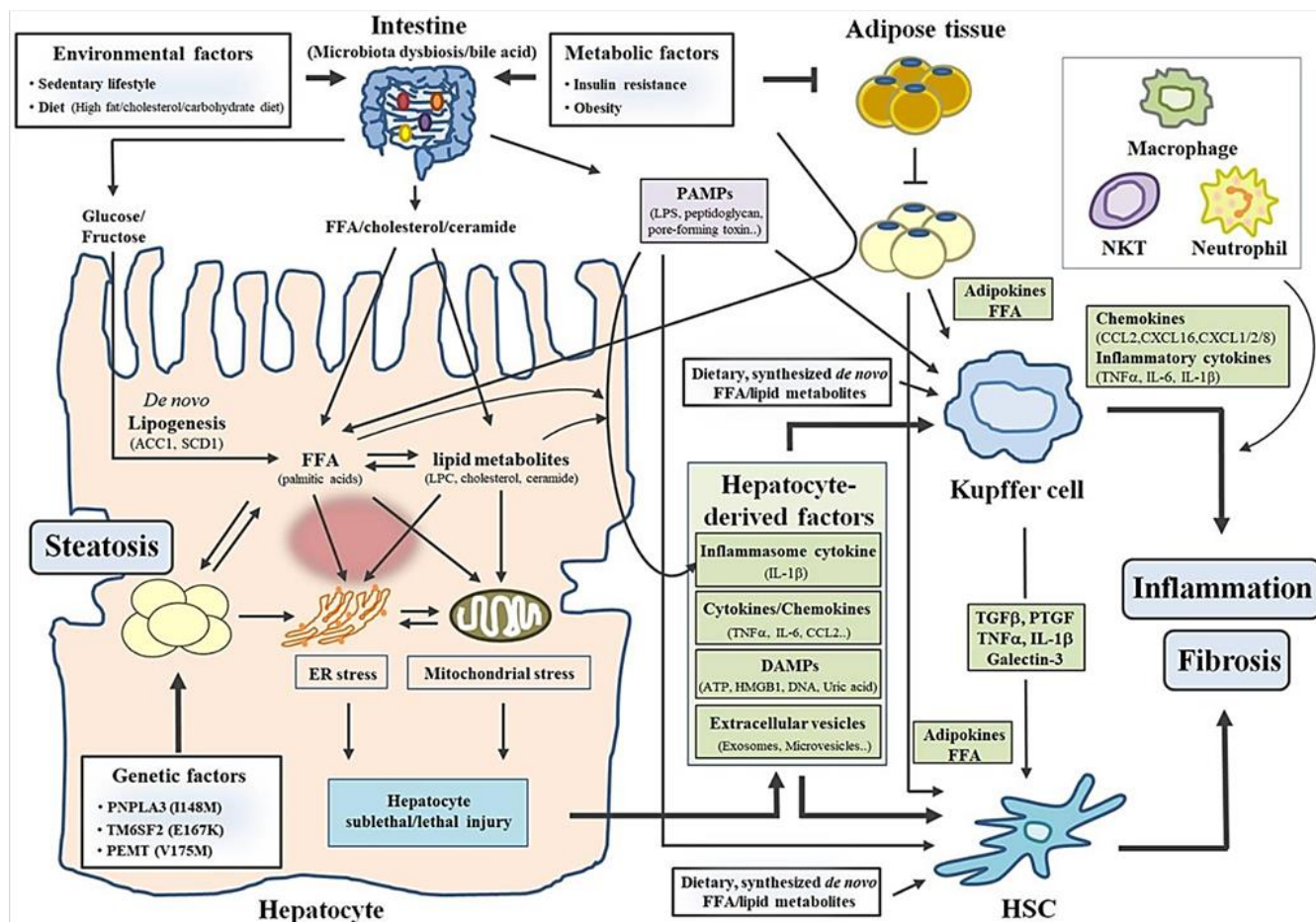


Figure 58: Récapitulatif de la pathogenèse de la NASH, d'après Kook Hwan Kim et al., 2018³²

Des facteurs environnementaux, métaboliques et génétiques contribuent au développement et à la progression de la NAFLD en NASH. Ces facteurs affectent simultanément plusieurs organes: le foie, l'intestin et le tissu adipeux. On assiste notamment à une augmentation du flux d'acides gras libres et d'espèces lipotoxiques dans les hépatocytes qui entraînent le développement d'une stéatose et permettent la mise en place d'un contexte inflammatoire. La libération par les hépatocytes de médiateurs de l'inflammation (cytokines, DAMPs...) stimulent les cellules de Kupffer qui vont activer une réponse immunitaire et les cellules stellaires. Dans ce contexte, la fibrose se développe induisant la progression de la NAFLD en NASH.

MI, des études mécanistiques poussées restent nécessaires pour prévenir des effets secondaires après modulation du MI qui pourraient s'avérer plus néfastes que le bénéfice spécifique ciblant la pathologie d'intérêt.

CHAPITRE 6 : MODELES ANIMAUX DE LA NAFLD/NASH

De nombreux modèles animaux d'étude de la NAFLD et de la NASH sont disponibles avec leurs qualités et leurs défauts. A ce jour aucun ne permet de retranscrire parfaitement le panel complet du spectre de lésions et de mécanismes impliqués dans la NAFLD et dans la NASH. Les modèles génétiques ont certains avantages notamment liés à une diminution du temps d'expérimentation mais sont extrêmement coûteux et parfois délicats à obtenir. De plus la plupart des mutations génétiques utilisées ne sont pas retrouvées chez l'Homme ce qui les rend moins pertinents. Du fait des différences substantielles existant entre humains et rongeurs d'un point de vue anatomique comme physiologique, la transposition à l'homme des résultats obtenus chez l'animal s'est régulièrement soldée d'un échec. Ainsi certaines molécules comme l'inhibiteur de phosphodiesterase-4 ASP9831, le resveratrol ou l'ézétimibe qui avaient tous montré des résultats concluants lors d'études *in vivo* n'ont pas tenu leurs promesses lors d'essais thérapeutiques chez l'humain.

Il est donc primordial d'avoir une perception claire du phénomène étudié afin de déterminer en amont le modèle le plus approprié prenant en compte les comorbidités de la pathologie, le degré de fibrose et la complication possible en cancer du foie.

Trois grands types de modèles sont aujourd'hui utilisés pour étudier la NAFLD et la NASH :

- Des modèles alimentaires ;
- Des modèles dits « chimiques » ;
- Des modèles génétiques.

L'ensemble de ces modèles utilise préférentiellement les souris ou les rats en raison de leur capacité intrinsèque de développement des caractéristiques de l'obésité, du diabète de type II et de la NAFLD. De nombreux paramètres conditionnent le temps de développement de la NAFLD et le stade : l'espèce animale utilisée, le sexe, la souche, la composition du MI et le type de régime utilisé.

Globalement l'ensemble des études chez l'animal est réalisé sur des mâles pour la NAFLD. Ces derniers présentent effectivement une prise de poids plus importante que les sujets féminins et cela permet de s'affranchir des variations hormonales liées au cycle oestrien.

I. **Modèles utilisant un régime alimentaire particulier**

A. **Régime déficient en méthionine et en choline (MCD)**

Le régime déficient en méthionine et en choline (MCD) est l'un des régimes couramment utilisés dans l'étude de la NAFLD. Il contient généralement un taux de sucre important (40%) et un taux modéré de lipides (10%). La méthionine et la choline sont deux nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme et leur absence s'accompagne d'une altération de la β -oxydation des acides gras et d'une altération de la production et de la sécrétion des VLDL conduisant à l'accumulation de lipides dans le foie comme détaillé dans le Chapitre 2. ²⁴⁶ De plus, ce régime entraîne une mort cellulaire des hépatocytes, l'apparition d'un stress oxydant et des modifications de production de cytokines et d'adipokines liées à la déficience en choline. L'absence de méthionine entraîne une stéatose rapide, dès 3 jours de régime et favorise le développement de l'inflammation et de la fibrose hépatique sous 2 à 8 semaines. Cependant, les animaux ne présentent pas le phénotype des patients NAFLD et en particulier ne montrent aucune obésité (voire même à l'inverse même une perte de poids), ni dyslipidémie, ou résistance à l'insuline. Ce modèle est donc optimal pour l'étude des événements intra-hépatiques liés au stade de NASH mais ne s'inscrit pas dans l'étude globale de la pathologie ²⁴⁷.

Un autre type de régime basé sur une déficience en choline est disponible : le régime CDAA (choline deficient amino acid) où le déficit en choline s'accompagne d'une déficience en L-acides aminés ²⁴⁸. De la même manière que le régime MCD, le régime CDAA entraîne le développement d'une fibrose caractéristique de la NASH. Cependant, la prise de poids, l'altération du profil lipidique plasmatique ou une intolérance au glucose, éléments majeurs de la NAFLD ne sont pas non plus retrouvés pour ce type d'alimentation, même lorsqu'il est combiné à un régime HFD ²⁴⁹.

B. **Régime athérogénique**

Le régime athérogénique contient une dose de cholestérol élevée de 1 à 1,25% et 0,5% d'acide cholique qui promeut l'absorption de lipides et de cholestérol, supprime la transformation du cholestérol en acides biliaires, augmente les taux de cholestérol dont le HDL-cholestérol et conduit au développement d'athérosclérose. Ce régime permet d'induire au bout de 6 semaines d'utilisation une inflammation et une stéatose et d'une élévation des ALAT, du cholestérol total et des TG. Après une utilisation plus prolongée sur 24 semaines on

assiste au développement d'une ballonnisation des hépatocytes et d'une fibrose. L'ajout de 60% de lipides (beurre de cacao) permet d'obtenir un phénotype caractéristique de la NASH en 12 semaines en accélérant notamment la ballonnisation des hépatocytes²⁵⁰. Le régime athérogénique réplique la NASH mais les changements métaboliques induits sont différents entre le modèle animal et l'humain avec une IR hépatique mais pas systémique et une perte de près de 9% du poids pour les rongeurs et des dépôts adipeux plus petits²⁴⁹.

Un autre régime athérogénique existe et permet de mimer les étapes de la NAFLD et de la NASH. Ce régime dépourvu d'acide cholique est enrichi en graisse, en sucrose et en cholestérol²⁵¹. Ganz et al., ont ainsi montré que l'utilisation de ce type de régime avec une supplémentation en cholestérol de 10% permettait d'obtenir un phénotype NAFLD en 8 semaines, le développement d'une NASH en 27 semaines et des signes de fibrose après 49 semaines de traitement.

C. Supplémentation en fructose

Le fructose est un monosaccharide métabolisé par le foie et extrêmement présent dans certains régimes alimentaires notamment aux USA où il joue un rôle délétère pour l'organisme. Dans la NAFLD, le fructose a été impliqué dans le développement de la stéatose, dans le déclenchement de processus inflammatoires et du stress oxydant et dans le développement de l'insulinorésistance. Il interagit de plus avec le MI et pourrait favoriser la dysbiose et donc le développement et la progression de la pathologie^{252, 253}. Dans les modèles animaux étudiant la NAFLD ou la NASH, le fructose est souvent ajouté dans l'eau de boisson. Il promeut en 2 mois le développement d'une stéatose simple chez des rats Wistar dont l'eau de boisson est supplémentée à 20%. Cette stéatose s'accompagne d'une prise de poids significative et d'une augmentation des taux plasmatiques de glucose et de TG²⁵⁴. Les souris supplémentées par 30% de fructose dans leur eau de boisson présentent taux de TG hépatiques triplé voir quadruplé s'accompagnant d'une augmentation de la stéatose et du poids corporel²⁵⁵. Une utilisation relativement courte ne permet pas de développement des éléments caractéristiques de la NASH comme la fibrose. Par contre, une surcroissance bactérienne intestinale avec endotoxémie et stimulation des cellules de Kupffer est observable²⁵⁶.

Le fructose est souvent utilisé en combinaison avec un régime enrichi en graisse (HFD) et va être soit ajouté directement au régime solide, soit incorporé à l'eau de boisson.

Des souris C57BL/6 nourries par un régime riche en graisses, en carbohydrates et dont l'eau de boisson est supplémentée par 55% de fructose développent après 16 semaines un phénotype caractéristique de l'obésité s'accompagnant d'une IR et une NASH fibrosante avec augmentation du stress oxydant hépatique, de l'infiltration de macrophages et d'une fibrose²⁵⁷. De même, un régime riche en graisses (42%), en fructose (42g/L) et en cholestérol (0.2%) induit les caractéristiques de l'insulino-résistance, de la stéatose, une ballonnisation hépatocytaire et une fibrose progressive²⁵⁸.

Une étude comparative a été menée par Sellman C, et al. sur trois régimes distincts : régime High-fat High-fructose (HFHFD), régime High-fat et supplémentation en fructose dans l'eau de boisson et régime High-fat simple²⁵⁹. Après 8 semaines d'utilisation, le premier régime combinant le fructose et le gras dans l'alimentation montrait une stéatose plus importante pour les souris et après 16 semaines on observait des éléments caractéristiques d'une inflammation hépatique non retrouvés dans les autres groupes. L'ajout de fructose à un régime riche en graisses favorise la fibrose hépatique, la ballonnisation hépatocytaire et l'inflammation du TA. Le phénotype de la NASH est donc recréé mais il est important de noter qu'une utilisation seule du fructose ne permet pas d'obtenir la pathologie.

Un des régimes alimentaires les plus étudiés est le régime ALIOS (American Lifestyle Induced Obesity Syndrome) contenant 45% de kcal issu des lipides, 30% d'acides gras trans et de l'eau de boisson avec fructose. 16 semaines de régime ALIOS induisent une stéatose importante qui s'accompagne d'une nécro-inflammation et d'une élévation des ALAT. Cependant ces données ne sont pas significativement différentes comparées à celle obtenues via un régime riche en AG trans-saturés sans ajout de fructose.

D. Régimes riches en graisses dits « HFD (high fat diet) »

Les régimes enrichis en graisses HFD sont extrêmement variables et largement utilisés comme modèles dans la NAFLD et la NASH. Ils permettent, via une augmentation des taux d'acides gras apportés, de stimuler l'accumulation de lipides dans le foie soit en relation avec le haut taux d'acides gras libres mis à disposition, soit via stimulation de la lipolyse. Ce régime permet de recréer certaines étapes pathogéniques de la NAFLD : obésité, hyperlipidémie et insulino-résistance dès 10 semaines d'utilisation²⁶⁰. Une des lacunes des régimes HFD est le

manque de développement de la fibrose n'en faisant pas un modèle totalement adéquat pour l'étude de la NASH. En effet, si on observe une stéatose dans la majorité des HFD, l'inflammation et donc la NASH est souvent cryptique, les ALAT peu augmentées et l'inflammation du foie doit être validée par une augmentation du profil inflammatoire hépatique. De plus, la fibrose n'est observée qu'à des phases tardives dépendantes de la nature du HFD. Le développement des éléments relatifs à la NAFLD varie dans le temps en fonction de l'espèce de rongeurs utilisée, de l'âge, de la durée du régime mais également du type de graisses utilisé. De manière générale la plupart des études utilisent un régime dont 60% des kcalories est issu du gras ²⁶¹. La nature du gras est variable et peut être soit du lard, soit de l'huile de soja, soit de l'huile d'arachide, ce qui modifie les quantités respectives d'acides gras saturés et insaturés. Il a été mis en évidence que les animaux recevant un régime enrichi en acides gras saturés présentaient une stéatose plus importante que ceux recevant un régime avec du lard standard ²⁶².

Parmi les variations de régime enrichi en graisses et au vu des effets délétères du fructose sur le métabolisme glucidique et lipidique, une combinaison high-fat, high-sucrose est parfois utilisée. Le taux de saccharose ajouté au régime varie selon les protocoles et l'association high-fat high-sucrose s'accompagne d'une augmentation de l'accumulation de lipides dans le foie et de la stimulation de la lipogenèse *de novo* ²⁶³.

II. Modèles chimiques

Les modèles définis comme « chimiques » se réfèrent aux protocoles où la pathologie est induite par administration de molécules chimiques. Les deux plus communément utilisés pour induire des pathologies hépatiques sont le tétrachlorure de carbone (CCL₄) et le Diethylnitrosamine (DEN).

A. Tétrachlorure de carbone (CCL₄)

L'administration du CCL₄ est une méthode largement utilisée pour étudier la fibrose hépatique²⁶⁴. Le CCL₄ est hépatotoxique et est capable d'induire un stress oxydant dans le foie favorisant l'accumulation de lipides toxiques et une réponse nécrotique majeure. Les métabolites du CCL₄ activent les cellules de Kupffer qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires aggravant les dommages hépatiques. De plus le CCL₄ induit une fibrose proportionnelle à la dose administrée s'accompagnant d'une nécrose des hépatocytes, d'une

ballonisation et d'une infiltration de cellules immunitaires couplées à une stéatose mixte micro et macrovésiculaire. Utilisé seul, le CCL₄ n'est pas capable d'induire une obésité ou une insulino-résistance d'où sa combinaison fréquente à des régimes enrichis en graisses. C'est un modèle animal facile à mettre en place et qui recrée rapidement la pathologie mais l'utilisation de CCL₄ a été associée à des décès animaliers par intoxication. Ce modèle bien que mimant les étapes de la NAFLD et sa progression vers l'état de fibrose caractéristique de la NASH n'est pas parfait. L'évolution pathogénique et les modifications histomorphologiques sont différentes de la stéatopathie hépatique humaine²⁴⁹. Seul, il n'induit pas d'obésité ni d'IR. Les rongeurs traités de manière combinée avec CCL₄ et un régime HFD présentaient une prise de poids moindre et un taux de cholestérol et de glucose plus bas que les rongeurs sous régime HFD simple²⁶⁵.

B. Diethylnitrosamine (DEN)

L'utilisation du DEN couplé ou non à un régime alimentaire HFD permet l'étude de l'évolution de la NAFLD vers l'hépatocarcinome cellulaire. Le DEN est un composé hautement carcinogène capable de causer un stress oxydant, des mutations d'ADN et de favoriser la lipotoxicité, le développement de la fibrose, d'une cirrhose et à long terme de lésions tumorales hépatiques²⁶¹. Si ce type de régime induit un état cancéreux, sa légitimité comme modèle d'étude du HCC comme aggravation de la NAFLD reste discutable, l'induction des lésions tumorales ne découlant pas du régime en lui-même.

III. Modèles génétiques

La NAFLD peut être répliquée via des modèles génétiques associés ou non à un régime hypercalorique.

A. Modèles génétiques mimant un diabète de type 2

Pour induire un diabète de type 2, il est possible d'utiliser un modèle de rongeurs présentant une mutation sur le gène codant la leptine rendant ces animaux déficients en leptine : Lep^{ob}/Lep^{ob} (ou ob/ob). La leptine est une adipokine sécrétée par le tissu adipeux blanc et qui entraîne un effet anorexigène en agissant sur l'hypothalamus. Les rongeurs déficients en leptine sont des animaux hyperphagiques, inactifs, extrêmement obèses. Ils présentent très rapidement une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline. A 12 semaines, ces rongeurs développent une stéatose hépatique mais les caractéristiques propres

à la NASH tels que la nécro-inflammation hépatique ou le ballonnement des hépatocytes restent absentes. Une stimulation externe soit par un agent chimique, soit un régime MCD est nécessaire pour induire une fibrose²⁴⁷. Bien que ce modèle ne permette pas l'étude des stades avancés de la NASH ni la progression de l'inflammation, il reste cependant le modèle génétique le plus utilisé dans l'étude de la stéatose lors de la NAFLD et des changements métaboliques accompagnant la pathologie.

Un autre modèle similaire le $Lepr^{db}/Lepr^{db}$ (ou db/db) existe où les rongeurs possèdent une mutation naturelle du gène codant pour le récepteur de la leptine le rendant non-fonctionnel. Les souris ont donc un phénotype similaire à celui des ob/ob mais présentent, elles, des taux élevés de leptine. Chez les rats, les rats Zucker $Lepr^{fa}/Lepr^{fa}$ ont une mutation analogue à celle des db/db et présentent le même phénotype que les ob/ob ou db/db . Comme pour les souris ob/ob , les db/db et les fa/fa ne développent pas spontanément une NASH et un facteur déclencheur externe est nécessaire.

Un autre modèle de DT2 est disponible et implique une mutation du gène $Alms1$ qui régule le contrôle hypothalamique de la satiété. Les souris foz/foz présentent une hyperphagie, une prise de poids et les caractéristiques d'un diabète de type 2. Si on couple cette mutation à un régime HFD, une NASH apparaît après une vingtaine de semaines²⁶⁶. Le développement de la NASH varie cependant en fonction des souches de rongeurs utilisées²⁶⁷.

Les souris déficientes pour le gène suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog) développent spontanément après 40 semaines une stéatose micro et macrovésiculaire, une stéatohépatite et une fibrose avec ballonnement des hépatocytes et infiltration inflammatoire. Ce modèle recrée les caractéristiques de la NASH humaine mais les souris KO ont une hypersensibilité à l'insuline et une diminution des taux de glucose plasmatique à jeun²⁴⁹.

B. Autres modèles génétiques

Certains modèles génétiques impactent la fonctionnalité de SREBP1c. Les souris transgéniques surexprimant SREBP1c présentent une stéatose marquée en 8 jours avec une IR significative. Après 20 semaines elles développent spontanément une fibrose hépatique et une stéatohépatite avec inflammation lobulaire, fibrose péri-cellulaire et ballonnement des hépatocytes^{249 268}. Si les caractéristiques de la NASH humaine sont pour la plupart mimées,

ces souris ne présentent pas de prise de poids ce qui n'est pas en adéquation avec la pathologie humaine²⁴⁶. Ce modèle semble plus approprié pour l'étude des lipodystrophies associées à une stéatohépatite.

Enfin on peut citer le modèle de souris KKAY/a résultant du croisement entre les souris KK et des souris obèses Ay. La mutation hétérozygote sur le gène *agouti* impacte la régulation hypothalamique de l'appétit et induit une hyperphagie et une obésité associées à une hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une IR. Ces souris développent également une stéatose hépatique mais l'aggravation des lésions vers la NASH n'est inductible uniquement que grâce à un stimulus extérieur supplémentaire comme le régime MCD²⁶⁹.

D'autres modèles animaux existent notamment des modèles génétiques d'athérosclérose et des modèles impactant le métabolisme des lipides. D'autres ciblent des étapes précises de la pathologie comme les processus inflammatoires afin de mieux en comprendre les mécanismes. Ces modèles complémentaires sont listés dans le tableau 2 mais ne seront pas décrits dans ce manuscrit²⁷⁰⁻²⁷⁸.

TYPE	DESCRIPTION	AVANTAGES	LIMITES	REF
ALIMENTAIRE	Régime déficient en méthionine et en choline (MCD)	- développement en 2 à 8 semaines des caractéristiques de la NASH dont inflammation et fibrose; - altération de la β -oxydation de Acs; - altération production + sécrétion VLDL; - Mort cellulaire des hépatocytes, apoptose et production de ROS	- non exploitable pour étudier l'ensemble des étapes de la NAFLD : pas d'obésité, pas de dyslipidémie, pas d'IR	252
	Régime déficient en choline et en L-acides aminés (CDOAA)	- développement de la NASH avec fibrose	- non exploitable pour étudier l'ensemble des étapes de la NAFLD : pas d'obésité, pas de dyslipidémie, pas d'IR	253
	Régime athérogénique (cholestérol + cholate) - 1 à 1,25% de cholestérol; - 0,5% d'acide cholique	- au bout de 6 semaines: augmentation des ALT; stéatose; inflammation; augmentation du cholestérol total et des TG - après 24 semaines: ballonnisation des hépatocytes + fibros	- processus métaboliques induits différents entre l'homme et l'animal en dépit d'une réplique histologique de la pathologie: IR hépatique mais pas systémique, perte de poids corporel, diminution des dépôts adipeux	251; 254; 259-263
	Régime enrichi en fructose majoritairement dans l'eau de boisson ou directement au sein du régime solide	- permet de recréer la NASH avec stéatose, ballonnisation hépatocytaire et fibrose progressive	- aggrave un régime enrichi en graisse mais ne permet pas à lui seul de recréer la NAFLD ou la NASH	254
	Régime riche en graisse HFD	- recrée les étapes pathogéniques de la NAFLD : obésité, hyperlipidémie et insulino-résistance	- Extrêmement variables dans leur composition - résultats variables en fonction de l'espèce et de la souche animale utilisée - ne permettent pas de recréer la NASH	253; 266
	Administration de lipides par gavages (4mg/kg/jour et 125 mg/kg/jour)	- contrôle de la dose exacte de lipides administrée	- technique expérimentale difficile nécessitant une parfaite maîtrise du manipulateur	266
CHIMIQUE	streptozotocine (administration intra-péritonéale ou sous-cutanée)	si couplée avec régime HFD : - stéatose simple dès 6 semaines d'utilisation; - ballonnisation hépatocytaire + inflammation dès 8 semaines d'utilisation - obtention des grandes étapes de la NAFLD humaine - permet l'étude des phénomènes physiopathologiques impliquant le stress oxydant - modèle facile et rapide	induction de l'IR par une voie différente de la physiopathologie humaine	275; 276
	tétrachlorure de carbone CCL4 (administration intra-péritonéale ou intra-gastrique)	- apoptose, inflammation hépatique, mise en place d'un milieu nécro-inflammatoire dans le foie, fibrose - potentialise l'effet d'un régime HFD et permet développement d'une NASH - modélisation rapide - faible coût	- peut causer la mort des animaux par empoisonnement; - pathogénèse, évolution de la maladie et changements histomorphologiques différents de la pathologie humaine	254; 264; 270
	tétracyclines	- toxicité minime par rapport à CCL4 - utile pour l'étude des stéatohépatites induites par des facteurs environnementaux	- ne permet pas d'étudier toutes les facettes de la NAFLD	254; 263; 277
	Diethylnitrosamine (DEN)	- couplé à un régime HFD permet l'étude de l'évolution de la NAFLD en CHC	- processus carcinogène différent par rapport à la physiopathologie humaine	266

Tableau 3: Modèles animaux de la NAFLD et de la NASH (1/2)

TYPE	DESCRIPTION	AVANTAGES	LIMITES	REF
GENETIQUE	Lep ^{ob} /Lep ^{ob} (ou ob/ob) (mutation du gène codant pour la leptine induisant une déficience en leptine)	- développement d'une stéatose hépatique en 12 semaines avec IR; - modèle génétique le plus utilisé dans l'étude de la NAFLD et des changements métaboliques qui l'accompagnent	- protection contre la fibrose - pas de développement de lésions hépatiques sévères typiques de la NASH - nécessité d'une stimulation supplémentaire (LPS, régime HFD ou régime MCD) pour induire une NASH	252
	souris Lep ^{db} /Lep ^{db} (ou db/db) ou rat Lep ^{fa} /Lep ^{fa} (mutation du gène codant pour le récepteur à la leptine)	- semblable au modèle ob/ob - développement stéatose + IR	- pas de fibrose ni d'inflammation sans stimulus additionnel	253
	souris foz/foz	- couplé à un régime HFD : apparition d'une NASH en 20 semaines	- lésions variables en fonction de l'espèce et de la souche de rongeur utilisée	271;272
	souris KO PTEN	- recrée la NASH humaine en 40 semaines	- hypersensibilité à l'insuline et diminution des taux de glucose plasmatique à jeûn	254;273
	souris transgénique SREBP1c	- recrée la majorité des caractéristiques de la NASH avec stéatose hépatique dès 8 jours et inflammation lobulaire, fibrose et ballonnisation hépatocytaire en 20	- pas de prise de poids - modèle préférentiel dans l'étude des lipodystrophies associées aux stéatohépatites	254
	souris KK ^Y /a	- stéatose hépatique, obésité, IR	- pas de développement spontané de la NASH; nécessité d'un stimulus supplémentaire de type régime MCD	274
	souris ApoE -/- ou LDL -/-	- développement des caractéristiques de la NASH sous régime HFD enrichi en cholestérol - outil d'intérêt dans l'étude de la NASH et de ses comorbidités cardiovasculaires	- nécessité d'un régime enrichi en cholestérol pour obtenir le phénotype de la NASH - résolution de l'inflammation et des dommages hépatiques dans la durée rendant le modèle vulnérable pour l'étude des phénomènes inflammatoires dans la NASH	280-282
	souris KO CD36	- développement stéatose hépatique + IR hépatique	- pas de développement de l'obésité, ni de l'IR systémique - pas de fibrose	283
	souris KO PPAR α	- si ajout régime HFD : développement stéatose - si ajout régime MCD : développement stéatohépatite majeure	- pas de développement de stéatose sous régime normal - pas d'obésité ni d'IR - pas de progression vers la NASH si utilisation d'un régime HFD simple	279
	souris KO AOX	- stéatose hépatique dès 7 jours et majeure à 8 semaines	- disparition de la stéatose hépatique à 6 mois - pas de fibrose - pas d'obésité - pas d'IR	251
	souris KO MC4R	- obtention d'un phénotype NASH si stimulation annexe par régime HFD notamment avec développement de l'obésité et IR - développement à terme d'un CHC	- développement des stades tardifs de la NAFLD/NASH	252; 269
	Modèles ciblant l'inflammation (KO CCR2; KO MCP1; KO TLR4 et TLR9; KO NLRP3)	- appréhension des mécanismes spécifiques impliqués dans la progression de la NAFLD en NASH	- ne recrée pas les caractéristiques globales de la pathologie	251

Tableau 3: Modèles animaux de la NAFLD et de la NASH (2/2)

IV. Transplantation fécale de microbiote intestinal

La transplantation fécale de microbiote (FMT) a pour vocation le remplacement d'un microbiote altéré par un microbiote considéré comme « sain » afin de restaurer une flore bactérienne bénéfique pour l'hôte. La FMT est notamment utilisée chez l'homme dans le cadre d'infections intestinales récidivantes à *Clostridium difficile* résistant aux antibiotiques^{279 280}. La FMT est la technique la plus drastique en terme de modification du MI car elle implique un remplacement majeur du contenu bactérien. Chez l'animal ces questions se posent également et les techniques de FMT sont extrêmement variables selon les protocoles. Les caractéristiques des souris receveuses (axéniques ou conventionnelles), l'utilisation préalable d'un lavage intestinal visant à enlever le MI original, la fréquence de FMT et les caractéristiques propres à l'échantillon transféré (congélation à sec ou en solution, travail sur fraction fraîche ou non...) sont des critères qui peuvent modifier les résultats de la FMT en terme d'implantation bactérienne. Il est également important de considérer les différences d'espèces possibles entre le donneur et le receveur. En effet certaines espèces bactériennes présentes chez un hôte peuvent être spécifiques de cet hôte et ne pas s'implanter chez le receveur après transplantation. C'est par exemple le cas des SFB (Segmented filamentous bacteria), bactéries commensales retrouvées chez le rongeur qui ne s'implantent pas chez l'Homme. Les modèles de souris associées au microbiote humain sont particulièrement utilisés pour mieux appréhender l'impact du MI dans une pathologie considérée.

Généralement, les animaux utilisés sont des souris axéniques qui reçoivent le MI d'un donneur humain malade et sont comparées aux souris axéniques recevant le MI d'un donneur humain sain. Ce modèle permet l'implantation d'un microbiote avec une diversité bactérienne élevée très proche de celui du donneur humain et une très bonne implantation de ce MI. Cependant l'utilisation de ce type de modèle animal comprend de nombreuses limitations. Le MI sert à la maturation du système immunitaire et gastrointestinal de l'hôte et ce dès la naissance. L'implantation d'un MI à l'âge adulte ne permet donc pas d'induire parfaitement ce qui se passe chez une souris colonisée dès la naissance. Ainsi, l'homéostasie chez l'hôte n'est pas parfaite²⁸¹. Ceci permet néanmoins de comparer l'effet de FMT issues de patients et d'individus sains et a permis d'étayer de nombreux mécanismes pathologiques liés au MI.

Outre le système immunitaire, l'épithélium digestif est lui-même différent chez des souris axéniques²⁸². Des études récentes ont montré que l'acquisition d'une couche de mucus comparable à celle de souris conventionnelles ne se fait que 8 semaines après la colonisation du tube digestif lors d'une FMT. Or, bon nombre d'études chez les souris axéniques colonisées, se font dans les 15 jours suivant l'implantation du MI et donc dans des conditions où l'épithélium digestif est encore « en transition ».

Par ailleurs, l'accès aux animaux axéniques restent à ce jour compliqué en terme d'infrastructure et de coût. De ce fait et afin de se rapprocher d'une situation plus comparable à celle qui peut être mise en œuvre chez l'homme, la FMT chez les souris conventionnelles s'est développée.

3 techniques sont possibles :

- Une FMT avec éradication préalable de l'écosystème de l'hôte via administration d'antibiotiques,
- Une FMT avec lavage préalable avec une solution de polyéthylène glycol (PEG),
- Une FMT sans éradication préalable du MI de l'hôte.

L'utilisation d'antibiotiques peut s'avérer problématique dans l'étude de certaines pathologies et fait partie des limitations de ce type de modèle. Une étude a montré que l'humanisation de souris conventionnelles par transfert de MI après lavage intestinal permettait d'implanter le nouveau microbiote de manière effective avec une seule FMT hebdomadaire pendant la durée du protocole²⁸³. Dans cette étude, la FMT était réalisée à partir d'un échantillon de fèces humain resuspendu dans une solution de Skim Milk et BHI (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson) enrichie en cystéine, environnement favorable pour la préservation des bactéries intestinales et conservée sous forme d'aliquots à -80°C. Comme dans la plupart des études menées sur le sujet, seule une fraction de l'échantillon bactérien est transférable par FMT peu importe la technique utilisée. De même les méthodes de conservation ne permettent pas le maintien de toutes les espèces bactériennes. Enfin, le nombre de FMT est crucial, une administration unique ne permettant pas d'implanter un MI dans le temps et des FMT trop nombreuses entraînent quant à elles des perturbations importantes du milieu intestinal pouvant avoir des effets délétères. De plus, des études montrent que les souris humanisées présentent une diminution des cellules intestinales de l'immunité innée et acquise avec diminution des taux de peptides anti-microbiens par rapport

aux souris ayant un MI murin. D'autres exemples démontrent qu'un microbiote non adapté impacte l'hôte différemment que lorsque le microbiote implanté provient de la même espèce que le receveur. Cela peut se révéler problématique lorsque les interactions du microbiome sont en lien avec les pathologies que l'on souhaite étudier ²⁸⁴. L'utilisation de modèles de souris humanisées est donc un outil intéressant pour comprendre l'impact du MI dans les pathologies telles que la NAFLD mais les résultats obtenus se doivent d'être pris avec précaution au vu des limitations techniques et biologiques de ce modèle.

Chapitre 7: STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DE LA NAFLD/NASH

La pathogénèse de la NAFLD est un processus complexe, varié et multifactoriel. Les stratégies thérapeutiques en place ciblent les différentes voies impliquées dans le développement de la pathologie : obésité, altération du métabolisme des lipides incluant les acides biliaires, insulino-résistance, inflammation, développement de la fibrose, réponse immunitaire et dysbiose intestinale.

I. Mesures hygiéno-diététiques

La NAFLD est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique dont l'une des composantes majeures est l'obésité. A ce titre, une stratégie primordiale à initier pour tout traitement est la mise en place de mesures hygiéno-diététiques visant un rééquilibrage alimentaire et une perte de poids.

16 essais cliniques randomisés ont évalué l'impact d'une perte de poids via des modifications du mode de vie dans la NAFLD. Dans ces études, l'apport calorique était déficitaire de 300 à 1000 kcal/jour ou basé sur une valeur calorique quotidienne comprise entre 1200 et 1800 kcal ou 20-30 kcal/kg/jour²⁶. Ces mesures diététiques s'accompagnaient généralement de l'introduction d'une activité physique modérée à raison de 30-60 min 3 ou 4 fois par semaine. Ces interventions permettaient une perte de poids modérée d'environ 4 kg s'accompagnant d'une amélioration des ALAT, des AST, des phosphatases alcalines et des GGT (gamma-glutamyl transférase), paramètres biologiques révélateurs de l'état de la fonction hépatique. De plus, on notait une réduction de la stéatose et de l'épaisseur du foie.

La composition du régime impacte également l'évolution des paramètres hépatiques. Ainsi une restriction en carbohydrates entraîne une diminution plus importante des triglycérides hépatiques comparée à une restriction calorique simple. De même, une étude sur le régime méditerranéen riche en acides gras mono et polyinsaturés et quasiment dépourvu de viandes rouges et de sucres raffinés montrait un meilleur impact sur les ALT, l'insulino-résistance et la stéatose hépatique par rapport à d'autres régimes²⁸⁵. L'European Association for the Study of the Liver (EASL) recommande une perte de poids de 7% pour permettre une résolution de la stéatose simple. L'amélioration de la fibrose et des phénomènes nécro-inflammatoires retrouvés au stade NASH nécessitent d'autres mesures qu'une amélioration simple du mode de vie. Des études confortent les recommandations de l'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) qui préconisent une diminution

de 10% du poids corporel afin d'atténuer voire de résoudre une fibrose légère à modérée et d'améliorer l'inflammation nécrotique du foie ¹⁷.

II. Vitamines et supplémentation

Au vu des résultats encourageants obtenus par l'utilisation du régime méditerranéen riche en acides gras polyinsaturés dans la NAFLD, une supplémentation en acides gras polyinsaturés PUFAs et en vitamines avec des propriétés anti-oxydantes est considérée dans la prise en charge de la NAFLD.

A. Acides gras poly-insaturés (PUFAs)

Une analyse comparative de 9 études regroupant 355 participants a évalué l'impact d'une supplémentation en oméga 3 ou en huile de poisson (riche en PUFAs) dans la NAFLD. Bien qu'extrêmement hétérogènes, certains résultats tendaient à montrer une amélioration de la stéatose hépatique et des taux d'ASAT chez les patients supplémentés ^{26, 286}.

B. Vitamine E

Une des voies impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD est la stéatose hépatique associée à une peroxydation lipidique induisant une déplétion en enzymes anti-oxydantes. De plus, les ROS jouent un rôle majeur dans l'avancement de la NASH. Les vitamines E et C sont capables de réduire le stress oxydant et ont donc été évaluées dans la pathologie. Lorsqu'associée à d'autres thérapies, la vitamine E semble favoriser la diminution de la stéatose, l'inflammation et le ballonnement des hépatocytes^{26, 287}. Cependant de hautes doses de vitamine E se sont révélées toxiques avec augmentation de la mortalité globale et de la mortalité cardiovasculaire chez les patients traités ²⁸⁸.

C. Resvératrol

Le resvératrol est un polyphénol contenu dans les baies comme le raisin, les myrtilles ou les mûres et qui pourrait présenter des propriétés intéressantes dans la prévention de la NAFLD. Le stress du RE est grandement impliqué dans le développement de la NAFLD. Le resvératrol semble protéger du stress du RE et de la stéatose hépatique induite par un régime enrichi en graisses. Il régule notamment l'expression de gènes impliqués dans la stéatose et modifie l'expression des PPAR, du TNF α et de l'IL-1 β chez le rat ^{26, 289}.

III. Procédures chirurgicales

Les procédures chirurgicales sont indiquées pour traiter l'obésité.. Ces procédures chirurgicales qu'elles soient de nature bariatrique ou endoscopique s'inscrivent depuis quelques années dans la prise en charge de la NAFLD en tant qu'option de perte de poids chez les patients pour lesquels les mesures hygiéno-diététiques se révèlent inefficaces. Dans la majorité des cas, la perte de poids induite entraîne une amélioration de la fonction hépatique²⁶.

Ainsi, une méta-analyse menée sur 32 études rapportant une chirurgie bariatrique sur des patients NAFLD et analysant le suivi grâce à une biopsie hépatique montre qu'une perte de poids d'environ 25% résulte en une résolution de la stéatose pour 66% de l'effectif, en une diminution de l'inflammation pour 50% des patients et en une amélioration de la fibrose pour 40% des patients ²⁹⁰.

IV. Thérapeutique médicamenteuse

L'EASL et l'AASLD ont émis des recommandations sur la prise en charge médicamenteuse des patients NAFLD et NASH ^{291 292}. Ainsi les thérapies médicamenteuses doivent être réservées aux patients présentant :

- Une NASH progressive (fibrose transitoire et cirrhose) ;
- Une NASH au stade primitif mais dont les patients sont à haut risque de progression (âge >50 ans, syndrome métabolique, diabète de type II, élévation des ALT) ;
- Une NASH active avec une activité nécro-inflammatoire conséquent.

Les médicaments considérés comme présentant une relevance dans la NAFLD/ NASH sont présentés dans le tableau 3 ^{287, 293 227, 294-312}.

Actuellement aucun médicament n'a été approuvé pour le traitement de la NAFLD/NASH que ce soit par la FDA (US Food and Drug Administration) ou par l'EMA (European Medicines Agency). Ainsi, les agences s'accordent sur le fait que tout médicament prescrit à visée thérapeutique explicitement pour la NAFLD ou la NASH soit considéré comme un traitement hors-AMM et que cette stratégie thérapeutique soit discutée avec le patient en prenant en compte la balance bénéfice/risque ²⁹³. Seul l'acide obéticholique (OCA), prometteur dans le traitement de la NASH est susceptible d'être le premier traitement médicamenteux de la NASH approuvé par la FDA après les résultats encourageants obtenus suite à l'étude

REGENERATE²²⁷. En effet en Juin 2020, la FDA pourrait élargir le champ de prescription de ce composé. Les résultats prometteurs obtenus avec l'OCA encouragent en parallèle le développement d'agonistes FXR moins toxiques que l'OCA.

ACTION	MEDICAMENTS	ACTION DANS LA NAFLD/NASH	LIMITATIONS	REF.
MÉDICAMENTS ANTI-DIABÉTIQUES	METFORMINE	Diminution de l'insulino-résistance hépatique et périphérique: <input checked="" type="checkbox"/> néoglucogénèse hépatique <input checked="" type="checkbox"/> lipogénèse <i>de novo</i> Augmentation de la β -oxydation des AG	effets secondaires gastro-intestinaux dont acidose lactique et hépatotoxicité	292; 299
	THIAZOLIDINEDIONE (rosiglitazone et la pioglitazone)	Agonistes de PPAR γ : - <input checked="" type="checkbox"/> taux d'adiponectine: <input checked="" type="checkbox"/> β -oxydation des AGs + <input checked="" type="checkbox"/> lipogénèse <i>de novo</i> et gluconeogénèse + propriétés anti-fibrotique - <input checked="" type="checkbox"/> adipogénèse: <input checked="" type="checkbox"/> dépôts de lipides ectopiques et amélioration de l'IR - Amélioration de la stéatose hépatique et de la fibrose	Infarctus du myocarde + cancers de la vessie : Médicaments retirés de la vente en France	26; 292; 299; 302;
	ANALOGUES DE L'INCRETINE	1. analogues de GLP-1 (Liraglutide) - résolution de la stéatose sans aggravation de la fibrose chez des patients NASH; - amélioration de la sensibilité à l'insuline, perte de poids et diminution de la DNL 2. Inhibiteurs de la DPP-IV (Sitagliptine) - corrélation entre le taux de DPP-IV et le stade de NAFLD/NASH - amélioration de la fonction hépatique	1. analogues de GLP-1: Manque de données et nécessité d'études complémentaires 2. inhibiteur de la DPP-IV: peu d'effet sur la NAFLD et la NASH malgré amélioration de la fonction hépatique	26; 292; 299; 303
INHIBITEURS DU CO-TRANSPORTEUR 2 SODIUM/GLUCOSE (SGLT2)	GLIFOZINES (ipraglifozine)	<input checked="" type="checkbox"/> excrétion urinaire de glucose: - perte de poids - amélioration de la fonction hépatique - amélioration de la fibrose hépatique	Effets secondaires urinaires dont urosepsis, infections uro-génitales et pyélonéphrites	26; 299
MÉDICAMENTS HYPOLIPEMIANTS	STATINES	<input checked="" type="checkbox"/> synthèse hépatique de cholestérol par inhibition de la HMGCoA reductase: Amélioration de la fibrose et de la stéatose hépatique	Résultats hétérogènes Potentiel hépatotoxique	26; 304
	EZETIMIBE	- <input checked="" type="checkbox"/> sensibilité à l'insuline, - <input checked="" type="checkbox"/> la stéatose, les taux de cholestérol et taux d'ALAT	Peu d'effets sur la fibrose et l'inflammation hépatique	17; 299; 305
REGULATEURS DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE HÉPATIQUE	INHIBITEURS DE L'ACC	- <input checked="" type="checkbox"/> DNL et de la stéatose hépatique - <input checked="" type="checkbox"/> β -oxydation des AGs	- Inhibiteurs de 1ère génération (PF-05175157) associés à hypertriglycéridémie - Inhibiteurs de seconde génération : <input checked="" type="checkbox"/> partielle de la DNL sans hypertriglycéridémie réactionnelle (en cours d'étude)	306
	INHIBITEURS DE FAS	TVB-2640 : inhibition de la DNL, efficace dans NAFLD et NASH	En phase 1	307
	INHIBITEURS DE DGAT1 et DGAT2	<input checked="" type="checkbox"/> DNL et <input checked="" type="checkbox"/> β -oxydation	Efficacité controversée sur la fibrose DGAT1: toxicité gastro-intestinale	306; 308; 309
AGONISTES DE FXR	ACIDE OBÉTICHOÏQUE	Anti-inflammatoire Anti-fibrotique	Potentiel athérogénique et Prurit +++	297; 301; 310; 311;
MÉDICAMENTS ANTI-HYPERTENSEURS	SARTANS (telmisartan, valsartan, losartan)	- Losartan : <input checked="" type="checkbox"/> fibrose hépatique + nécro-inflammation - Valsartan: amélioration IR + fibrose - Telmisartan: amélioration IR + fibrose + <input checked="" type="checkbox"/> taux d'AG circulants + stéatose	Nécessité d'études complémentaires	313-317

Tableau 4: Stratégies thérapeutiques médicamenteuses dans la NAFLD et dans la NASH

V. Modulation du MI comme piste thérapeutique

A. Utilisation des antibiotiques

Une des stratégies utilisées pour modifier l'effet des composants bactériens et de leurs métabolites est l'administration d'antibiotiques. Deux catégories d'antibiotiques existent : ceux absorbables et ceux non-absorbables. Les antibiotiques absorbables traversent la barrière intestinale et présentent des concentrations sériques thérapeutiques. Les antibiotiques non-absorbables restent quant à eux dans le milieu intestinal où ils exerceront une action locale. Des associations combinées comme neomycine + polymyxine B ont ainsi montré leur efficacité dans la diminution de la translocation bactérienne induite par un régime riche en fructose. De même, certains antibiotiques comme la rifaximine ou le métronidazole permettent de traiter les patients cirrhotiques et sont utilisés depuis les années 50. La rifaximine a une activité anti-bactérienne contre certaines bactéries entériques de type *Streptococcus*, *Bacteroides* ou *Citrobacter* et son administration pendant une période courte chez des patients NAFLD ou NASH était associée à une amélioration clinique de ces patients avec diminution des transaminases et de l'endotoxémie³¹³. Certains antibiotiques spécifiques peuvent quant à eux revêtir un caractère quasi « eubiotique » en favorisant le développement d'espèces bactériennes bénéfiques telles que *Bifidobacteria* ou *Lactobacilli*.

Bien que des améliorations cliniques soient notées, l'utilisation d'antibiotiques à long terme reste compliquée à mettre en place de par les effets indésirables bien connus que cela implique et notamment le développement d'une résistance aux antibiotiques ou le développement de complications chez les patients immunodéprimés¹⁷⁴.

B. Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques

L'utilisation de probiotiques comme stratégie thérapeutique dans la NAFLD est une option intéressante qui s'inscrit dans l'ère de la thérapie ciblée et personnalisée. Plusieurs souches présentant un bénéfice thérapeutique pour le maintien de l'équilibre intestinal sont déjà commercialisées et incluent des bactéries telles que les Lactobacilles, des Streptocoques et les Bifidobactéries. Dans la NAFLD, un complexe de 8 souches bactériennes, le VSL#3 a suggéré son efficacité dans l'amélioration de l'IMC et de la stéatose chez les patients obèses présentant une stéatohépatite métabolique. D'autres associations de probiotiques ont été étudiées et notamment des complexes de plusieurs souches de *Lactobacillus*, de *Streptococcus* et de *Bifidobacterium*. Les résultats obtenus ont montré une amélioration de la

fibrose, de l'inflammation hépatique et des ASAT ³¹⁴. Une autre étude associant *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* induisait quant à elle en une amélioration de la fonction biologique hépatique ³¹⁵.

D'autres essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'impact des probiotiques dans la NAFLD. L'essai clinique NCT02764047 évalue les changements hépatiques induits après administration de *Lactobacillus acidophilus* ATCC SD5221 et *Bifidobacterium lactis* HN019 pendant 6 mois chez des patients NASH ³¹⁶. L'essai clinique NCT04074889 évalue quant à lui l'effet de l'administration pendant 6 mois d'un complexe de *Lactobacillus* & *Bifidobacterium* [*Lactobacillus acidophilus* (107mg), *Lactobacillus casei subsp* (107mg), *Lactobacillus lactis* (107mg), *Bifidobacterium bifidum* (107mg), *Bifidobacterium infantis* (107mg) and *Bifidobacterium longum* (107mg)] chez des patients NAFLD. Les paramètres analysés ici concernent l'inflammation hépatique, la fibrose et la perméabilité intestinale. L'essai NCT01922830 a testé le potentiel bénéfique du SupHerb25 un complexe de 11 bactéries brevetées chez des patients obèses avec une NAFLD et ayant été traités par chirurgie bariatrique ³¹⁶.

La NAFLD étant une pathologie complexe impliquant des voies pathologiques variées, l'utilisation de plusieurs souches bactériennes ayant des actions et des cibles diverses semble plus efficace que l'utilisation d'une seule souche, en l'état actuel des connaissances. Bien que prometteurs, des études complémentaires sont indispensables pour clarifier les mécanismes d'action des probiotiques dans la NAFLD et dans la NASH. La littérature s'avère prolifique lorsqu'il s'agit de démontrer l'effet bénéfique ou au contraire délétère d'une bactérie dans le processus physiopathologique de nombreuses maladies. Les résultats issus des études dont le but est de servir de preuves de concept de l'effet d'une bactérie spécifique dans la pathologie d'intérêt sont souvent contrastés. Si on prend le cas du syndrome métabolique, deux études s'appuyant sur des données humaines et sur des expérimentations animales ont abouti à des résultats parfaitement controversés sur *Prevotella copri*. Dans la première étude, *P.copri* était associée à une amélioration du métabolisme du glucose et de la sensibilité à l'insuline via augmentation de la production de succinate. Une colonisation par *P.copri* de souris sous régime high fat/high sucrose permettait l'induction de ce phénotype bénéfique et l'utilisation de souris déficientes pour la G6P, enzyme limitante de la gluconeogenèse montrait que le succinate produit par *P.copri* constituait un mécanisme essentiel pour l'amélioration de la

sensibilité à l'insuline et du métabolisme du glucose ³¹⁷. A l'inverse, l'équipe de Pedersen a mis en évidence que le métabolome des individus insulino-résistants était caractérisé par la présence de haut taux d'acides aminés branchés (BCAA) et deux bactéries dont *Prevotella copri* étaient reliées aux voies métaboliques impliquées dans l'augmentation de synthèse des BCAA ³¹⁸. Le gavage de souris sous régime HFD par *P.copri* aggravait l'intolérance au glucose, diminuait la sensibilité à l'insuline et augmentait les concentrations sériques en acides aminés branchés (BCAAs).

D'un autre côté de nombreuses études ont démontré une diminution d'*Akkermansia muciniphila* chez les patients NAFLD, obèses et diabétiques comme dans le MI des souris obèses et diabétiques. Une supplémentation en fibres non digestibles entraînait l'augmentation des taux d'*A. muciniphila* et était associée à une amélioration des paramètres glucidiques et lipidiques ainsi qu'à un renforcement de la barrière intestinale ³¹⁹. De même l'utilisation de metformine et les chirurgies bariatriques étaient associées à une augmentation importante d'*A. muciniphila* allant jusqu'à 20% du MI total ^{320, 321}. Là encore quelques études nuancent ces résultats en témoignant d'une augmentation d'*A.muciniphila* chez des souris recevant un régime riche en graisses et en saccharose ^{322, 323}. Un des détracteurs d'*A.muciniphila* concerne sa relative abondance dans des populations de patients atteints de maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques (SEP) et questionne sur le potentiel bénéfique d'une bactérie dans une maladie spécifique et sur la complexité des fonctions du MI ^{324, 325}. Si cela peut s'expliquer par les caractéristiques propres au régime des patients SEP, les deux exemples présentés ici montrent l'importance d'une analyse minutieuse et d'une démonstration solide de l'imputabilité des probiotiques quant à leurs effets bénéfiques ou délétères. Il reste ainsi extrêmement délicat d'arguer qu'une bactérie est impliquée dans un phénotype en se basant uniquement sur des variations relatives à son abondance au sein du MI. La compréhension du mécanisme d'action des bactéries impliquées dans la protection ou au contraire l'aggravation de la pathologie et notamment l'implication des métabolites bactériens pourraient être une alternative thérapeutique d'intérêt.

Actuellement l'efficacité réelle des probiotiques dans la prise en charge de la NAFLD reste floue et se limite à des hypothèses. Si différentes études tendent à montrer une amélioration des paramètres hépatiques grâce à l'action de certaines souches, des études complémentaires sur des cohortes plus larges et de durée plus longue sont primordiales pour mieux

appréhender les mécanismes liés à ces probiotiques et identifier les souches d'intérêt, le dosage adéquat et s'assurer de l'innocuité à long terme de ces produits. De plus, de nombreuses pistes restent à explorer quant à la synergie existante entre les différents probiotiques d'intérêt.

Une autre piste thérapeutique réside dans l'utilisation de prébiotiques, substrats utilisés de manière sélective par le microbiote et induisant un bénéfice pour l'hôte. Plusieurs composés avec des qualités de prébiotiques ont été testés dans la NAFLD. Les études menées chez le patient étaient construites de manière hétérogène tant sur les critères d'évaluation utilisés que sur le type de prébiotique administré. Malgré tout, une analyse comparative de l'ensemble de ces études montrait une amélioration de la fonction biologique hépatique avec diminution des transaminases ³²⁶. Une étude chez l'animal avec enrichissement du régime par de l'oligofructose non digestible et fermentable, permettait de diminuer le poids corporel, de réduire l'expansion de l'adiposité et de contrôler l'inflammation induite par un régime riche en graisses ³²⁷. Chez la souris, l'utilisation d'oligofructose permet de restaurer un taux adéquat de *Bifidobacterium spp.* dont l'expression est diminuée dans les pathologies métaboliques comme l'obésité. Cela s'accompagne d'une amélioration de la tolérance au glucose, de l'insulinorésistance et de l'environnement inflammatoire lorsqu'elle est associée au régime HFD ³²⁷. En plus de cet effet bifidogénique, les prébiotiques permettent l'augmentation d'autres bactéries d'intérêt et notamment *Faecalibacterium prausnitzii* dotée de propriétés anti-inflammatoires ainsi qu'*A. muciniphila* qui est négativement corrélée à la prise de poids ³²⁸. Une étude menée sur des souris sous régime HFD recevant une supplémentation en COS (chitosan oligosaccharides) a montré une suppression de l'ensemble des désordres métaboliques gluco-lipidiques avec notamment un retour d'une sensibilité à l'insuline adéquate et de l'intégrité de la barrière intestinale. L'analyse du MI montrait que le COS induisait une augmentation de croissance d'*A. muciniphila* et de *Lachnospiraceae_UCG_001* et une diminution de *Lachnospiraceae_NK4A136*, d'*Alistipes*, d'*Helicobacter* et d'*Odoribacter* ³²⁹

Chez le patient NASH, une étude conduite sur une petite cohorte de patients recevant de l'oligofructose, montre une amélioration du score de fibrose NAS et de la stéatose malgré une absence de modification du poids corporel ³³⁰.

De manière générale, l'utilisation de fibres non digestibles et hautement fermentables est considérée comme bénéfique pour les pathologies métaboliques en raison de leur potentiel bifidogénique et de leur capacité à diminuer le ratio Firmicutes/Bacteroidetes. Les fibres de type fructane comme l'inuline sont capables de contrer l'adipogenèse, de diminuer l'IMC, d'augmenter les taux de PYY et GLP-1, de diminuer les taux de LPS circulants, de diminuer l'inflammation et de réguler le métabolisme glucidique et lipidique³²⁸. Enfin, dans un modèle murin de NAFLD la pectine a induit une amélioration du métabolisme lipidique en diminuant le stress oxydant ce qui était corrélé à une augmentation de production de l'acétate et du propionate. La composition du MI était aussi modifiée avec notamment une augmentation des *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Olsenella* et *Bifidobacterium*³³¹

De nombreuses études mécanistiques sont nécessaires pour combler les manques relatifs à la compréhension des effets propres des fibres dans l'amélioration des hépatopathies nutritionnelles mais on assiste à une accumulation de preuves de l'utilisation bénéfique de ces thérapies dans la prise en charge de la NAFLD et de la NASH.

C. FMT

La transplantation fécale de microbiote a pour vocation le remplacement d'un microbiote altéré par un microbiote considéré comme « sain » afin de restaurer une flore bactérienne bénéfique pour l'hôte. Le succès thérapeutique de la FMT en clinique a été extrêmement documenté avec un taux de guérison de plus de 90% dans le cadre des infections à *Clostridium difficile*^{279, 332}. Des applications similaires sont considérées pour le traitement des hépatites alcooliques sévères et dans la NAFLD. La FMT est une procédure particulière qui soulève de nombreux questionnements d'un point de vue technique. L'une des interrogations réside notamment dans la fonctionnalité du microbiote implanté et dans la composition bactérienne de ce dernier³⁰⁷. Comme la transmission de pathogènes ne peut être exclue, les donneurs sont rigoureusement sélectionnés. Ainsi les facteurs de risques du donneur, l'existence de transfusions sanguines, les pathologies sous-jacentes et l'historique familial relatif aux pathologies auto-immunes ou malignes sont des critères de sélection des candidats « sains ». Une fois sélectionnés, le sang et les fèces des patients sont analysés à la recherche d'éventuels pathogènes³³³.

Chez l'homme peu d'études ont à ce jour été menées dans la NAFLD/NASH. Une étude portant sur la FMT à partir de donneurs sains et minces pour traiter des patients présentant

un syndrome métabolique a montré une amélioration de l'insulinorésistance périphérique chez les patients receveurs six semaines après transplantation de fèces et une tendance à l'amélioration de l'insulinorésistance ³³⁴. Trois essais cliniques sont en cours utilisant la FMT comme traitement dans la NAFLD/NASH (NCT03803540, NCT02469272 and NCT02721264), témoignant de l'intérêt grandissant porté à cette alternative thérapeutique. Néanmoins la FMT revêt un certain nombre de challenges logistiques et la FDA a déterminé que la FMT constitue un produit biologique. Elle répond donc à la définition d'un médicament de par son utilisation pour le traitement et l'atténuation d'une pathologie et sa capacité à affecter le corps de manière structurelle et fonctionnelle ³³⁵. A ce titre la FMT et l'ensemble de ses procédures tombent sous la juridiction de la FDA. Si aux Etats-Unis, la FMT répond à une réglementation drastique, en Europe les procédures sont allégées et simplifient la mise en place d'essais cliniques. Deux enjeux majeurs sont identifiés : la caractérisation détaillée des donneurs et la surveillance des effets à long-terme chez le donneur. De plus l'identification des souches bactériennes bénéfiques reste primordial de même que la mise au point de procédures standardisées de culture et de stockage de ces bactéries répondant aux spécificités des bonnes procédures de fabrication appliquées dans l'industrie pharmaceutique ce qui représente une charge conséquente pour les acteurs impliqués ³³⁶. Si la FMT apparaît comme une stratégie thérapeutique innovante, de nombreuses études restent à mener tant pour confirmer son efficacité dans la NAFLD que pour s'assurer de son innocuité dans le temps. En effet, la FMT implique le transfert de microbiote intestinal soit comme la définition le précise de bactéries mais également, de virus, de levures et d'archées dont les fonctions propres sont largement méconnues³³⁷. L'inquiétude principale réside dans les effets indésirables à long terme pouvant découler de la FMT et en particulier l'induction de maladies chroniques liées à l'altération du MI chez le receveur.

La NAFLD et la NASH connaissent une expansion croissante dans le monde. Actuellement, aucune thérapie n'a prouvé son efficacité totale dans la prise en charge de la pathologie très certainement en raison d'une pathogénicité extrêmement complexe à appréhender.

PROJET DE THESE

L'essor de la stéatopathie métabolique non-alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) suit l'épidémie d'obésité et l'accroissement du diabète de type 2 au sein de la population générale. Touchant près d'un quart de la population mondiale, la NAFLD est un enjeu de santé publique majeur avec un coût économique élevé. La NAFLD pourrait devenir la première cause de transplantation hépatique dans le monde et à ce jour aucun traitement pharmacologique spécifique de cette pathologie n'a été approuvé par les autorités de santé. D'énormes efforts sont mis en place pour mieux appréhender cette pathologie et ses complications aussi bien en termes de diagnostic que de mécanistique.

La NAFLD correspond à la manifestation hépatique du syndrome métabolique et est définie par une accumulation de lipides dans le foie. Elle peut se compliquer en NASH avec apparition d'une inflammation hépatique. Une fibrose se développe progressivement et une partie des patients présentera à terme une cirrhose et parfois un carcinome hépatocellulaire. De nombreux facteurs environnementaux comme les régimes occidentaux riches en graisses, en hydrates de carbone et appauvris en fibres participent à la genèse de cette pathologie et à son développement. Parmi les co-facteurs influençant l'évolution de la NAFLD, le microbiote intestinal (MI) apparaît comme une cible thérapeutique d'intérêt. En effet, il a été montré que la dysbiose contribuait au développement de la pathologie et de ses complications par divers mécanismes. Notre équipe a notamment prouvé que le transfert du MI de souris malades à des souris axéniques permettait de reproduire la pathologie¹⁸⁹. Le MI produit des métabolites tels que les acides biliaires et les acides gras à chaîne courte (small-chain fatty acid, SCFAs) qui peuvent avoir des rôles bénéfiques ou délétères dans la pathogenèse de la NAFLD. Notre équipe a par ailleurs travaillé sur la modulation de la composition du MI par les fibres alimentaires dont la pectine et a montré le bénéfice thérapeutique de ce composé dans la maladie alcoolique du foie (MAF)³³⁸ chez la souris. Ces résultats ont orienté nos hypothèses de travail et la construction de notre plan expérimental dans la NAFLD.

Tenant compte des résultats encourageants obtenus dans la MAF, nous avons souhaité dans un premier temps asseoir le rôle de la pectine dans la protection des lésions hépatiques engendrées par un régime gras (high fat diet, HFD). Nous avons administré un régime HFD supplémenté ou non en pectine à faible dose (2%) à des souris conventionnelles pendant 4

mois. Nous avons pu caractériser la dysbiose induite par ce régime et l'influence de la pectine sur la composition du MI et sur les organes d'intérêt dont le foie et les tissus adipeux.

Au vu des effets bénéfiques induits par l'utilisation de la pectine en traitement préventif, nous nous sommes ensuite questionnés sur son potentiel curatif dans la NAFLD. En parallèle, prenant en compte la modulation du MI observée lors de notre protocole préventif, nous avons souhaité comprendre si la pectine exerçait son action bénéfique via la modulation du MI. Pour répondre à ces questions nous avons procédé à des transferts de MI modulé par la pectine (fecal microbiota transfer, FMT) à des souris conventionnelles soumises à un régime HFD, soit de manière préventive et donc dès l'initiation du régime ; soit de manière curative et donc après induction d'une NAFLD. Les FMT ont été réalisées conformément au protocole mis en place par notre équipe au sein de notre laboratoire afin d'optimiser le transfert et l'implantation des espèces bactériennes issues des souris donneuses²⁸³.

L'ensemble des données obtenues est présenté sous forme d'un article dans la première partie des résultats.

Avec une faible dose de pectine, nous sommes en mesure d'induire certains bénéfices en curatif comme en préventif sur les lésions de la NAFLD chez des souris soumises à un régime HFD. Cependant, n'étant pas capables de restaurer l'ensemble des paramètres physiologiques altérés par le régime et faisant face à une certaine hétérogénéité de réponse des souris par rapport au régime gras choisi, nous avons décidé de mener un projet sur l'impact de hautes doses de pectine (15%) sur les lésions hépatiques induites par un régime plus délétère enrichi en graisses, en sucre et en cholestérol (HFSC). Ces résultats complémentaires sont présentés dans la seconde partie de la section « résultats ».

Tout au long de ma thèse j'ai participé aux différents projets des membres de l'équipe orientés vers la maladie alcoolique du foie et les acides biliaires. Enfin, dans le cadre de ma thèse d'exercice de Pharmacie j'ai co-écrit une revue de littérature sur les atteintes hépatiques liées aux inhibiteurs de tyrosine kinase qui sera présentée en annexe de ce manuscrit.

RESULTATS

RESULTATS - *Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses*

I. Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD in obese mice

Camille Houron¹, Dragos Ciocan^{1,2}, Françoise Mercier-Nomé³, Nicolas Trainel¹, Cindy Hugot^{1,2}, Laura Wrzosek¹, Vanessa Liévin-Le Moal¹, Gladys Ferrere¹, Cosmin Sebastian Voican^{1,2}, Gabriel Perlemuter^{1,2*}, and Anne-Marie Cassard^{1*}

*Corresponding authors :

Anne-Marie Cassard : INSERM U996, 32 rue des carnets 92190 Clamart, France.

Tel: +33 1 41 28 80 37

Fax: +33 1 46 32 79 93

cassard.doulcier@u-psud.fr

Gabriel Perlemuter : INSERM U996, 32 rue des carnets, 92190 Clamart, France.

Tel: +33 1 41 28 80 37

Fax: +33 1 46 32 79 93

gabriel.perlemuter@aphp.fr.

¹Université Paris-Saclay, Inserm U996, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92140, Clamart, France.

² AP-HP, Hepato-Gastroenterology and Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France.

³ Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, Institut Paris Saclay d'Innovation thérapeutique, 92296, Châtenay-Malabry, France

ARTICLE EN PREPARATION

Acknowledgments. The authors thank the Animex2 Platform (M. Levant and B. Lecomte) for the follow-up of the mice, the Biochemistry Platform (Bichat) for plasma quantification, the PHIC platform (M. Ocimek), and the PLAIMMO platform (ML Aknin). We also thank the NED team (O. Zemb, B. Gabinaud) and the GeT-PlaGe platform for their help with the sequencing

RESULTATS - *Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses*

data and ICANalytics, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France for SCFA analysis.

Disclosures: DC received travel funds from Biocodex and Gilead, lecture fees from Gilead, and royalties from John Libbey Eurotext. GP received travel funds from Janssen and Gilead, consulting fees from Bayer, Biocodex, Roche, Gilead, Pierre Fabre, and Servier, and royalties from Elsevier-Masson, Solar, Flammation/Versilio, and John Libbey Eurotext. AMC received travel funds and consulting fees from Biocodex and royalties from Elsevier-Masson, Solar, Flammation/Versilio, and John Libbey Eurotext. All other authors declare no conflicts of interest.

Financial support: This work was supported by INSERM, Université Paris-Sud, “Fondation pour la recherche médicale” (FRM), “Institut de Recherches Internationales Servier” (IRIS), the National French Society of Gastroenterology (SNFGE), “Association Française pour l’Etude du Foie” (AFEF), and “Groupement transversal INSERM sur le microbiote” (GPT microbiota). Cho received a CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) scholarship in collaboration with the IRIS. DC received a grant from Biocodex.

Authors’ Contributions: LW and DC: contributed equally to this work for the study concept and design, acquisition, analysis, and interpretation of data, and drafting of the manuscript. Chu, MSp, Cho, VLLM, VP, GF, and MSt: technical support. MD: histological analysis. SD, DE, and GK: fecal metabolite quantification. CSV: provided patients. HS: provided AhR KO mice. HS and PE: tryptophan metabolite analysis. GP: critical revision of the manuscript, obtained funding, and provided patients. AMC: study concept, design, and supervision, analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript, and funding raising.

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

INTRODUCTION

Overweight and obesity are linked to an increased risk of metabolic syndrome including insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, mixed dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) ¹. Among overweighted/obese patients, only a subset of individuals will develop severe liver lesions. It has been demonstrated that intestinal microbiota (IM) plays a major role in the individual susceptibility of patients to develop NAFLD ^{2,3}. The large overlap between NAFLD and metabolic disorders may complicate the establishment of a specific bacterial signature associated with the disease spectrum. Nevertheless, the recent review allows to propose in NAFLD and/or NASH the involvement of some bacterial genus including an increase of *Akkermansia*, *Dorea*, *Escherichia*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Ruminococcus* and *Shigella*, a decrease of *Alistipes*, *Faecalibacterium* and *Haemophilus* and at the level of species an increase of *Propionibacterium acnes* and a decrease of *Clostridium coccoides* and *Bacteroides fragilis* ⁴.

The composition of IM in adults depends on several features including the primary colonization, antibiotics treatments, infections, environment, genetic polymorphism and obviously nutrients ⁵⁻⁷. The Western-style diet, enriched in fat and sugar and low in fibers contribute at least in part to depletion of specific bacterial taxa in the IM ^{8,9}. These alterations may result in dysfunctions, contributing to the increase in the development of chronic inflammatory diseases including those associated with obesity ¹⁰. Western diet induces a prolonged metabolic stress which leads to adipose tissue dysfunction, inflammation, and adipokine release that trigger the liver injury. IM is partly involved in the metabolic disorders observed with this diet ¹¹. Moreover, modifications of the IM leading to the improvement of metabolic disorders, decrease the adipose tissue inflammation and favor the browning of white adipose tissue ¹².

Thus, the analysis of the bacterial signature in NAFLD is important for the follow-up of patients and change the IM to restore a "healthy" IM could be relevant. Indeed, impact of dietary fibers on gut microbiota is clearly established ¹³. It has been shown that fibers prevent liver injury depending of the type of fiber: galactomann worsens liver injury while inulin or pectin could improve it ¹⁴⁻¹⁶. Moreover, we have already demonstrated that pectin alters IM composition and improves alcoholic liver injury ¹⁷. Nevertheless, the increase of fibers in the diet could be related to an increase of discomfort or even intestinal pain compromising their use in some

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

individuals. Understanding which the beneficial bacteria are, specifically involved in the protective effect of fibers, remains relevant to develop new probiotics treatments.

In the current study, we addressed the role of pectin and intestinal microbiota as a preventive and curative treatment of diet-induced obesity (DIO) related liver lesions by adding pectin in a high-fat diet (HFD). Then, the IM from DIO mice treated with pectin was transplanted in DIO mice, both before or after the development of obesity. Moreover, we analyzed the effect of the addition of pectin in a HFD pectin after the establishment of obesity.

MATERIALS AND METHODS

Animal trials and diets. Five-weeks-old male C57BL/6J mice were purchased from Janvier laboratory (Le Genest, France) and maintained under a 12h light/dark schedule, with food and water *ad libitum* and treated in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996). Animal experimentation procedure was validated by the local ethics committee, CEEA26 (APAFiS #02734.03, APAFiS #4255-2016080812089425v1 and APAFiS #20833). Mice were fed either a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD) with or without pectin (2%) in which the energy content of fat was either 4.1% or 34.7% respectively. The caloric content was 360.9 kcal/100g (ND), 351.3 kcal/100g (ND 2%), 516.2 kcal/100g (HFD) and 506.7 kcal/100g (HFD²). The HFD diets were performed with lard (31.5%) (SNIFF, Germany). Pectin, extracted from apples, was purchased from Sigma-Aldrich (P93854, lot: BCBS3576). All diets were manufactured by SNIFF (Germany). Mice were weighted every weeks and diet intake was measured and averaged for each cage (4 mice per cage).

Fecal microbiota transfer. Microbiota transfer was performed by feces gavage using a modified version of a previously described protocol¹⁸. Feces were recovered from 54 mice (C57BL/6J fed either with ND, ND2%, HFD or HFD2%), diluted in BHI (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson) supplemented with 0.5mg/ml L-cysteine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 20% skim milk (Becton Dickinson) (vol/vol) and stored in aliquots at -80°C. Then, 100 µl volume containing 3.33 mg of feces was administered to each corresponding mouse twice a week for 2 months.

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

Glucose tolerance. Oral glucose tolerance test (OGTT) were performed as follow: a glucose load (2 g/kg) was given by gavage after 6h of fasting and blood samples were taken from the tail vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min after the gavage. Serum glucose concentrations were determined by the Accu-Chek® Performa (Roche, Switzerland) and the area under the glucose–time curve was calculated.

Tissues and samples Mice were anesthetized and blood samples collected in EDTA coated tubes. The serum was use for liver alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), HDL-cholesterol and triglycerides (TG) determination. The livers were excised, weighed and either fixed in buffered paraformaldehyde 4% or frozen for further TG, RNA extractions. Proximal ileum and colon were cut into two pieces: one piece was flushed, opened longitudinally, cut into 2 cm sections and fixed in 4% paraformaldehyde and the other piece was frozen for further RNA extraction. Fecal samples were collected by proper removal from the colon for gut microbiota analysis. Caecal content was collected in two separated tubes and frozen. Brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT) were cut into two pieces: one piece was fixed in 4% paraformaldehyde for histology investigations, the other piece was frozen for further RNA extraction. All samples were stored at -80°C until use.

Measurement of liver triglycerides and plasmatic transaminases Triglycerides were extracted using an Abcam Triglyceride Assay Kit - Quantification (Cambridge, UK) and measured with a Mithras LB940 (Berthold Technologies). The level of TG is expressed in nmol per milligram of liver. Transaminases (ALT and AST) were assessed by a spectrophotometric method (Olympus, AU400).

Liver and adipose tissues histology Liver and adipose tissues (BAT and WAT) were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Liver, white adipose tissue and brown adipose tissue paraffin sections (3 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Nucleus count of white adipose tissue section was performed by fluorescence microscopy using nuclear counterstain method with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Images were digitally captured from the scan slides using NanoZoomer 2.0-RS and the NDP.view2 software (Hamamatsu, Japan).

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

RNA extraction and quantification Mice livers, BAT and WAT were disrupted in Qiazol solution and total RNA was extracted using a Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Courtaboeuf, France). Total gut RNA was extracted using a Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Courtaboeuf, France). Both were extracted after being disrupted with an MP Biomedicals FastPrep. The RNA integrity number (RIN) was determined using an Agilent Bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 Nano Labchip kit. Samples had a RIN of 8 for liver tissues and a RIN of 7 for gut, BAT and WAT tissues. For cDNA synthesis, 5 µg of each total RNA sample was reverse transcribed. A 6 µl mix containing 5 µg of RNA, random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France), and 10 mM dNTP Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) was prepared for each sample. Mixtures were heated at 65°C for 5 min, cooled on ice, and then an 8 µl reaction mix containing 1 µl M-MuLV RT (Invitrogen), 4 µl 5x Buffer (Invitrogen), 2 µl 0.1 M dithiothreitol (Invitrogen), and 1 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl; Invitrogen) was added. The reaction conditions were 10 min at 25°C, 50 min at 50°C, 15 min at 70°C.

Gene expression analysis by quantitative PCR Real-time qPCR was performed in a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) using the LC FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics). Amplification was initiated with an enzyme activation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of a 20 s denaturation step at 95°C, a 15 s annealing step at the temperature appropriate for each primer, and a 10 s elongation step at 72°C. We amplified the Primer sequences of amplified target that are listed in **Supplemental Table 1**. Data were analyzed using LC 480 Software (Roche Diagnostics). Relative gene expression was normalized to the 18S or GAPDH reference gene.

Bacterial DNA extraction and analysis of the gut microbiota by 16s Ribosomal RNA sequencing Bacterial DNA was extracted from feces using a Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit (Courtaboeuf, France), after being disrupted with an MP Biomedicals FastPrep. The composition of the fecal microbiota was analyzed using Illumina MiSeq technology targeting the 16S ribosomal DNA V3-V4 region in paired-end modus (2 x 300 base pair) (GenoToul, Toulouse) as described previously¹⁷.

The non-chimeric sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97.0% sequence similarity using a closed reference-based picking approach with UCLUST software against the Greengenes database 13_8 of bacterial 16S rDNA sequences¹⁹. After

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

rarefaction at 4,000 reads per sample, bacterial alpha diversity was estimated using Shannon Index. OTUs with a prevalence < 5% were removed from the analysis. Analyses using R software v2.14.1 were restricted to merged OTUs with the same taxonomic assignment. Results are represented as the mean \pm SEM. The Wilcoxon test was used to assess statistical significance of the bacterial composition between the different samples. Associations were considered to be significant after a false-discovery rate (FDR) correction of the p-value ($q < 0.05$).

Beta diversity was assessed using weighted and unweighted UniFrac distances. The weighted UniFrac metric is weighted by the difference in the abundance of OTUs from each community, whereas unweighted UniFrac only considers the absence/presence of the OTUs providing different information. Both are phylogenetic beta diversity metrics. The link between the different groups of mice and bacterial microbial profiles was addressed by performing an ANOSIM test with 10,000 permutations on the beta diversity metrics described above. Linear discriminative analysis (LDA) effect size (LEfSe) analysis was performed to identify the taxa displaying the largest differences in abundance in the microbiota between groups²⁰. Only taxa with an LDA score >2 and a significance of $\alpha < 0.05$, as determined in Wilcoxon signed-rank tests, are shown.

Statistical analyses Results are represented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test (Graphpad Prism, Graphpad Software Inc, La Jolla, California, USA); $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTS

Pectin prevents liver injury in DIO mice and is associated with morphological changes of white adipose tissue and intestinal microbiota modifications

Mice were fed a high fat diet (HFD) or a HFD containing 2% of pectin (HFD², 0.06g of pectin / 30 g of mice) for 16 weeks. Pectin had no effect on the diet intake and the weight gain (**Fig.S1A-B**). Pectin prevented the development of steatosis in HFD fed mice as shown by histological analysis and triglycerides quantification (**Fig. 1A-B**). Also, mice fed HFD² had a slightly decrease of liver inflammation as compared to HFD, characterized by a decrease of inflammatory genes expression (**Fig.1C**). In line with the absence of weight loss in HFD² fed mice, there was no change in the weight of epididymal white adipose tissue (WAT) (**Fig.1D and Fig.S1C**). However, histological analysis showed a typical browning of WAT with a significant decrease of the semi-quantified adipocyte diameter in HFD² fed mice (**Fig.1E**). A morphological change of WAT was also observed in ND² fed mice compared to ND fed mice (**Fig.S1E**). The histological analysis of the brown adipose tissue (BAT) showed a lowering of lipid droplets size in HFD² fed mice (not quantified) (**Fig.S1F**). Glucose sensitivity was not improved in HFD² fed mice as compared with HFD fed mice (**Fig.1F**). Of note, pectin did not induce any changes in lipid absorption (**Fig.S1D**) and there was no effect of pectin in mice fed a chow diet (ND and ND²) (**Fig.1 and Fig.S1**).

HFD induced modifications of the intestinal microbiota as shown by the principal coordinate analysis and the relative abundance of the main phyla (**Fig.2A-B**). We then focused on the changes in the IM induced by pectin in HFD² fed mice, which were associated with improvement of the liver injury. Pectin decreased the relative abundance of Firmicutes independently of the diet (**Fig.2B**) and increased Bacteroidetes specifically in HFD² fed mice (**Fig.2C**). Pectin also increased *Prevotella* and Turicibacterales and conversely decreased Desulfovibrionales and *Ruminococcus* in HFD² fed mice as compared with HFD fed mice (**Fig.2C**). It should be noted that pectin was able to increase Bifidobacteriales in ND² fed mice compared to ND fed mice (**Fig.S2B-C**). Interestingly, at this dose of pectin, we observed a decrease in the relative abundance of Proteobacteria independently of the diet (**Fig.2B**).

The effect of pectin on the IM is dose dependent as lower dose of pectin dampened the changes in IM composition. This could explain why a pectin dose of 0.4% associated with the HFD was not sufficient to improve liver injury (**Fig.S3**).

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin in DIO mice

To investigate if IM modifications induced by pectin play a role in the improvement of liver injury, we collected the IM of mice fed with a HFD supplemented or not with pectin and performed fecal microbiota transfer (FMT). We transplanted the IM from HFD obese mice or from HFD obese mice treated with pectin to control mice as a preventive treatment before the induction of obesity, identified as FMT^{HFD}+HFD and FMT^{HFD2}+HFD respectively. Similarly, we transplanted the IM, after the induction of obesity as a curative treatment, identified as HFD+ FMT^{HFD} or HFD+FMT^{HFD2} (**Fig.3A**). As observed in DIO mice fed with or without pectin, there was no change in diet intake, weight gain, WAT accumulation, ALT or glucose sensitivity both in preventive or curative FMT (**Fig.S4A to G**). No significant changes were noticed regarding steatosis while using FMT in a preventive manner (**Fig.3B**). Conversely, curative FMT decreased steatosis as shown with hepatic triglycerides content and histological analysis (**Fig.3C**).

Curative and preventive FMT of IM from mice fed with pectin in the HFD were both able to induce metabolic changes in the WAT, as shown by the decrease of adipocytes size and the expression of mRNA genes involved in the browning function (**Fig.3D to G**). Besides, when used preventively, FMT increased fatty acids β -oxidation in the WAT highlighted with an increase of *CPT1* expression. This finding was not found with curative FMT (**Fig.3F-G**). Conversely, the curative FMT induced a decrease of inflammatory markers illustrated by a decrease of *CCL2*. Which was not observed with the preventive FMT (**Fig.3F-G**). As BAT was concerned, both curative and preventive FMT induced morphological changes with a replacement of lipid macrovacuoles by microvacuoles (**Fig.S5C**). These modifications could be a marker of BAT activation and could be the result of the use of lipids as an energy source.

Principal coordinate analysis of the IM showed that preventive or curative FMT modify the IM of recipient mice as already demonstrated ²¹ (**Fig.4A to D and Fig.S5A**). Curative and preventive FMT with pectin-modified IM induced changes in IM of recipient mice. We observed a significant increase in Bacteroidetes and a significant decrease in Epsilonbacteraeota. Changes in IM composition were different depending on preventive or curative use of the FMT (**Fig.4A to D and Fig.S5A-B**). Preventive FMT increased *Muribaculum* and *Ruminococcus* and decreased Peptostreptococcaceae, *Clostridium stricto sensu*, *Ruminococcus gnavus*, *Romboutsia* and *Paraclostridium*. Curative FMT increased Prevotellaceae, *Alloprevotella*, *Streptococcus* and *Ruminococcus torques* and decreased

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

Ruminococcaceae, Mycoplasmataceae and Helicobacteraceae including *Helicobacter*. These differences could explain the discrepancies which were observed in short-chain fatty acids (SCFAs) quantification after preventive or curative FMT (**Fig.4E and F**). Indeed, analysis of caecal content of SCFAs showed that preventive FMT induced a decrease of isobutyrate and isovalerate amount whereas curative FMT induced an increase of acetate, butyrate and propionate concentrations.

Pectin used as treatment in DIO mice induces changes in white adipose tissue morphology and intestinal microbiota composition without restoring a healthy phenotype

We next studied if pectin used as a treatment on DIO mice could better recapitulate the preventive effect of pectin. To this end, we fed mice for 16 weeks with HFD to induce NAFLD then mice were supplemented with 2% of pectin (HFD+HFD²) or not (HFD+HFD) (**Fig.5A**). Eight weeks of treatment with pectin 2% did not have any effect on body weight, diet consumption or glucose sensitivity (**Fig.5B and C and Fig.S6A-B**). Moreover, there was no improvement of the liver injury as shown by histological analysis of the steatosis(**Fig.5D**), triglycerides content and ALT quantification (**Fig.5D**)

As shown for FMT treatment, curative treatment by pectin in DIO mice induced morphological changes of WAT as showed through the reduction of adipocytes diameters after 8 weeks of pectin treatment (**Fig.5E**). Although there were no changes regarding WAT weight and *UCP1* expression, pectin induced increase of *CPT1* expression (**Fig.5E-F**). Surprisingly, treatment with pectin 2% induced the expression of *CCl2* and *F4/80* in the white adipose tissue letting implying that pectin triggered inflammation in this tissue (**Fig.5F**).

Similarly, to the preventive use of pectin or FMT interventions, curative treatment with pectin 2% induced a shift in IM composition compared with DIO mice (**Fig.6A**). Bacteroides were induced by pectin as previously showed by the use of pectin before the DIO or FMT. Among the other modifications, we found as in FMT treatment an increase of *Muribaculum* and *Ruminococcus*. The other changes included an increase of Bacillales, Rhodospirales, and Staphylococcaceae; and a reduction of Rikenellaceae, Prevotellaceae and Tannerellaceae at the family level. At the genus level, we observed an increase of *Staphylococcus*, *Acetatifactor*, *Agathobacter* and *Ruminococcus torques* and a decrease of *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Anaerovax*, *Clostridioides*, *Rombutsia Paraclostridium* (**Fig.6B**).

DISCUSSION

Il est maintenant établi que le MI joue un rôle dans le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité, le surpoids, l'insulinorésistance ainsi que la NAFLD^{22, 23}. Le développement de stratégies permettant de corriger le MI a donc un intérêt évident pour la prise en charge de telles pathologies. En ce sens, les prébiotiques, sont très étudiés bien que leurs mécanismes d'action soient encore largement incompris. Ainsi, identifier les bactéries et les métabolites bactériens²⁴ impliqués dans les effets bénéfiques d'un prébiotique revêt un intérêt majeur pour développer de nouvelles pistes thérapeutiques. Les prébiotiques sont définis comme « des aliments non-digestibles qui affectent bénéfiquement l'hôte en induisant une stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité d'une ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes du MI qui confère un bénéfice santé pour l'hôte » et dont les effets sont prouvés scientifiquement^{25, 26}. De nombreuses fibres alimentaires telles que les fructo-oligosaccharides (FOS), l'inuline ou les galato-oligosaccharides (GOS) répondent à ces caractéristiques²⁷. La pectine de par ses propriétés peut être assimilée à un prébiotique.

Dans notre étude, nous avons analysé le rôle préventif et curatif de la pectine sur le développement des lésions hépatiques chez des souris soumises à un régime enrichi en graisses. Afin de déterminer si les effets bénéfiques de la pectine sont médiés par les modifications du MI, nous avons réalisé des transplantations fécales de souris soumises au régime pectine chez des souris obèses et analysé les modifications de certains métabolites bactériens. Nos résultats montrent qu'une partie des effets de la pectine est liée à des modifications du MI et des métabolites bactériens, notamment les acides gras à chaîne courte. Néanmoins, si la pectine utilisée en préventif est capable de prévenir l'apparition des lésions hépatiques, les autres interventions induisent des effets plus contrastés. Ainsi, les transplantations fécales de MI modifié par la pectine atténuent modérément l'accumulation de lipides dans le foie. Cet effet bénéfique est lié à une amélioration du métabolisme des tissus adipeux. Ces résultats sont en accord avec la littérature et suggèrent une connexion entre le microbiote intestinal, les métabolites bactériens, les tissus adipeux et l'amélioration des pathologies métaboliques telles que la NAFLD.

Administrée de manière préventive chez des rongeurs soumis à un régime HFD, la pectine permet donc de prévenir l'apparition des lésions hépatiques et induit un brunissement du tissu adipeux blanc. Le microbiote intestinal des souris est modifié par la pectine et favorise l'augmentation de certaines bactéries productrices de SCFAs dont les

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

Bacteroides (productrice d'acétate et de propionate) et les *Turicibacter*. Les Turicibacterales, qui produisent du butyrate, ont été inversement corrélées à un phénotype NAFLD, et retrouvées diminuées chez les patients NAFLD²⁸. Ici, l'augmentation de ces bactéries pourrait donc contribuer à l'amélioration de la stéatose lors de l'utilisation de la pectine en préventif.

En revanche, utilisée à faible dose en traitement curatif et pendant une courte durée, la pectine n'est pas capable de restaurer les lésions hépatiques induites par le régime gras mais entraîne un changement de composition du MI associée à une modification morphologique et fonctionnelle du tissu adipeux blanc (TA). En curatif, les modulations du MI varient par rapport au traitement préventif ce qui pourrait en partie expliquer les différences entre les effets observés.

D'autres études utilisant la pectine en association à un régime HFD témoignent du bénéfice de cette fibre dans la prévention des lésions induites par un régime gras^{15, 29-35}. Dans ces études, la pectine permet une amélioration de la stéatose hépatique avec une diminution du poids corporel et de la masse grasse et parfois une amélioration de la tolérance au glucose. La supplémentation en pectine entraîne systématiquement une modulation de la composition du MI et une augmentation de la production des SCFAs. Ces modulations diffèrent entre les études en fonction de la dose de pectine et du type de pectine. Par rapport à notre étude, les doses de pectine sont plus importantes (10 à 20%). Entre autres, Li et al., ont mené une étude très similaire à la nôtre avec des doses de pectine de citron de 4% et 8% administrées de manière préventive à des souris sous régime HFD¹⁴. Ils démontrent que la pectine ajoutée au régime HFD (30% de lard) prévient la stéatose hépatique et ce en fonction de la dose de pectine ajoutée, ce que nous prouvons également en démontrant qu'une dose inférieure de pectine (0,4%) n'exerce plus ses effets protecteurs sur le foie. Dans leur étude, l'action de la pectine induit une diminution de la masse corporelle et de la masse grasse sans modification de l'apport énergétique. Dans notre étude, 2% de pectine ne modifie pas ces paramètres ce qui réaffirme que les effets de la pectine semblent être dépendants de la dose administrée et liés aux modulations du MI et à l'action des acides gras à chaîne courte (SCFAs).

Afin de se rapprocher de la situation rencontrée avec les patients, nous avons administré la pectine en curatif tout en poursuivant un régime HFD. Dans ces conditions, le MI est bien modifié mais la pectine n'est pas capable de diminuer les lésions hépatiques malgré un brunissement du WAT. Une étude menée par Safari et al. avait montré que la consommation

RESULTATS – Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

d'un régime appauvri en graisses permettait en une semaine de restaurer les paramètres physiologiques altérés par huit semaines de régime HFD et notamment la stéatose hépatique³⁶. Leur étude montrait que les altérations du MI induites par le HFD étaient en partie réversibles après retour à un régime appauvri en graisses. Nous avons également réalisé ce type d'expériences et observé les mêmes effets (données non décrites).

Afin de prouver que les effets bénéfiques de la pectine sont bien liés aux modifications de l'écosystème bactérien, nous avons réalisé des transplantations de MI (fecal microbiota transplantation ; FMT). Ces FMT sont réalisées soit de manière préventive soit en curatif après 4 mois de régime HFD. Dans ces conditions, la survenue des lésions hépatiques n'est pas prévenue par le FMT préventif, mais elles sont atténuées par le FMT curatif. Néanmoins, on observe systématiquement une modification morphologique des tissus adipeux, et notamment un brunissement du tissu adipeux blanc.

Les FMT influent également sur la composition du MI des souris transplantées. Le MI modifié par la pectine, qu'il soit utilisé en préventif ou en curatif, induit une augmentation des Bacteroidetes et des bactéries productrices de SCFAs (*Muribaculum*, *Ruminococcus 1* pour la FMT préventive et *Alloprevotella* et *Ruminococcus torques* pour la FMT curative)^{37, 38}. Ces modifications du MI pourraient expliquer les effets sur les tissus adipeux. En effet, le MI est un modulateur majeur de l'homéostasie métabolique de l'hôte et de la balance énergétique. Il impacte ainsi le fonctionnement des tissus adipeux³⁹. Il a été mis en évidence qu'une déplétion ou une absence de MI chez des souris entraînait d'une part une diminution de la capacité d'extraction de l'énergie à partir du bol alimentaire et d'autre part une activation du BAT. Ces données suggèrent une augmentation du catabolisme des lipides dans le BAT^{40 41, 42}. Cet effet semble être associé à la production de SCFAs dont les trois principaux sont le butyrate, l'acétate et le propionate⁴³. D'autres SCFAs existent en petite quantité comme l'isobutyrate, le valérate et l'isovalérate. Des études montrent notamment que les SCFAs sont capables d'agir sur le foie et le TA via activation de l'AMPK et diminution de la lipogenèse *de novo*^{29, 44}.

Nous avons donc déterminé la composition en SCFA chez les souris transplantées. Lors de l'utilisation préventive de la FMT, on observe une diminution des taux d'isobutyrate et d'isovalérate sans modifications des taux de butyrate, d'acétate et de propionate. L'isobutyrate et l'isovalérate ont été associés au développement de l'insulino-résistance (IR) et des pathologies métaboliques. Dans une étude menée par Le Roy et al. sur l'induction de la

RESULTATS – Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

NAFLD par FMT de MI issues de souris développant un syndrome métabolique après un régime HFD, les souris qui développaient une stéatose avaient également une élévation de l'isobutyrate et de l'isovalérate, des acides gras ramifiés issus de la fermentation bactérienne de la leucine et de l'isoleucine³. Ces acides gras ramifiés ont été associés à une IR et au développement des pathologies métaboliques⁴⁵. En préventif, le MI modifié par la pectine pourrait donc atténuer la fermentation protéique entraînant un effet bénéfique pour les souris transplantées. *Muribaculum* et *Ruminococcus* sont associés respectivement à une production de propionate, d'acétate et de butyrate. Dans le caecum, étonnamment, ces SCFAs ne sont pas modifiés alors que l'on pourrait s'attendre à leur augmentation ce qui corrèlerait avec les observations lésionnelles. L'équipe de Den Besten a mené deux études portant sur l'effet bénéfique des SCFAs (soit l'acétate, soit le butyrate, soit le propionate) sur les effets délétères induits par un régime HFD^{46,47}. Les SCFAs étaient directement incorporés au régime (HFD+ butyrate ou HFD+acétate ou HFD+propionate) ou apportés par le MI après incorporation de gomme guar au régime HFD. Dans les deux cas, il était observé une diminution de la stéatose hépatique et un remodelage du TA de manière similaire à nos résultats^{46,47}. D'un point de vue mécanistique, Den Besten montrait que l'action bénéfique des SCFAs découlant d'une supplémentation du régime en fibres était corrélée non pas aux concentrations en SCFAs dans le caecum mais au flux circulant de ces SCFAs^{46,47}. Il serait donc utile dans notre étude de mesurer ces SCFAs plasmatiques en plus du dosage caecal.

Dans notre étude, nous montrons que la pectine exerce son action bénéfique en induisant le brunissement du TA, ce qui se traduit au niveau hépatique par une diminution de l'accumulation hépatique des TG. Ces observations sont compatibles avec les données sur l'effet bénéfiques des SCFAs dans des souris soumises à un régime HFD⁴⁷. Le propionate et l'acétate agissent directement sur les tissus adipeux et induisent une augmentation d'*UCP1* et de *CPT1* dans le TA avec diminution du diamètre adipocytaire, comme nous l'observons^{48,49}. Ces modifications morphologiques des tissus adipeux ont été associées à une inhibition de la lipolyse du TA et à une augmentation de l'adipogenèse⁴⁸⁻⁵². L'activation de la thermogenèse et l'augmentation de *CPT1* indiquent une modification du métabolisme des acides gras avec augmentation de la dépense énergétique via l'induction de la β -oxydation mitochondriale. Les modulations d'activité des tissus adipeux pourraient entraîner une diminution du flux d'AGs arrivant au foie et réduire ainsi l'apport exogène en substrats. Par ailleurs, le brunissement du TA a été associé à une modulation d'expression de PPAR γ impactant l'ensemble des gènes de

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

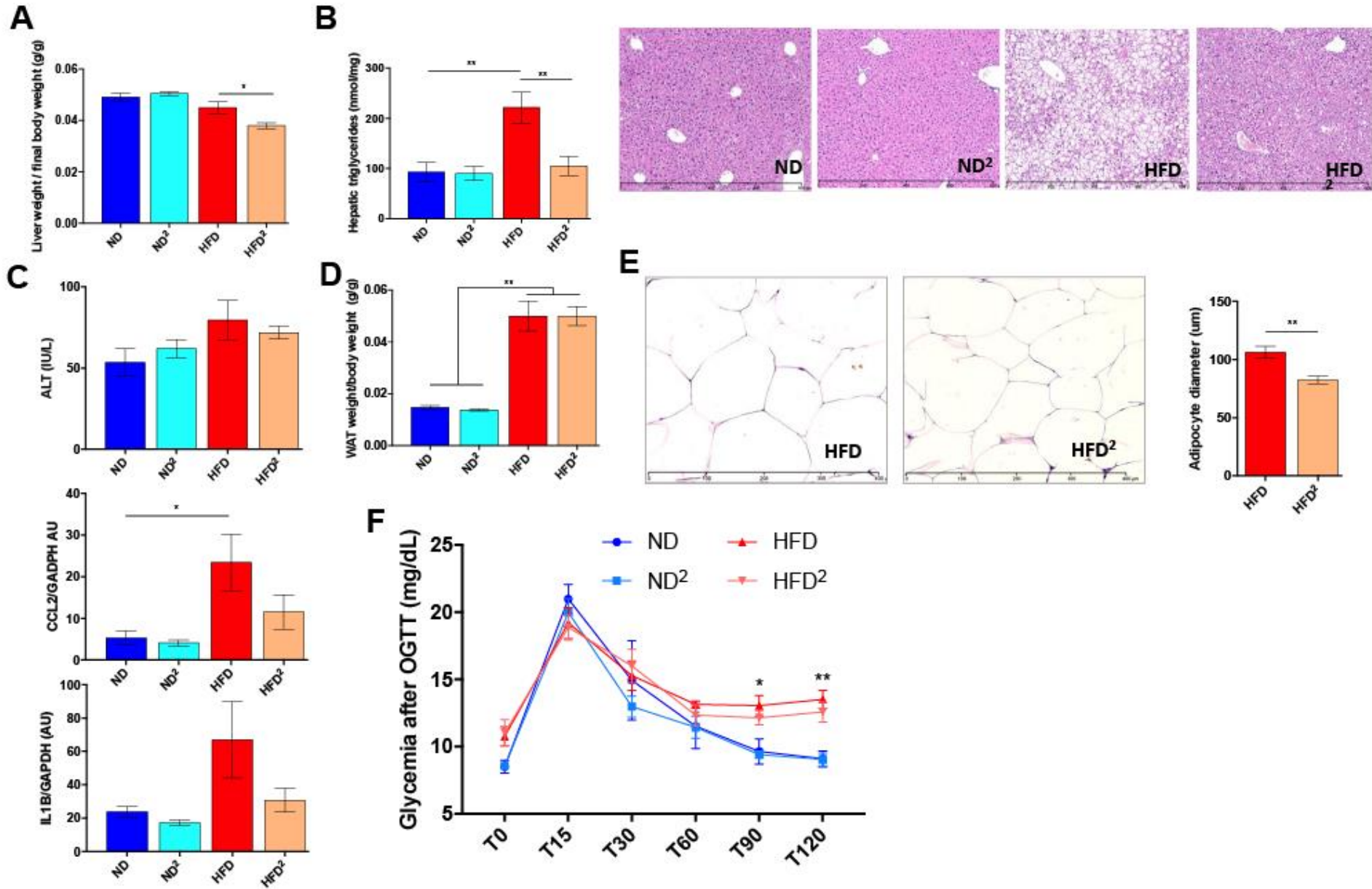
Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

la lipogenèse *de novo*⁴⁷. L'étude de l'expression de ces gènes dans le foie permettrait de mieux comprendre les rouages mécanistiques associés à l'amélioration de la pathologie.

En curatif, la FMT module différemment le contenu caecal en SCFAs. Ainsi, on assiste à une augmentation des taux de butyrate, de propionate et d'acétate sans modifications de l'isobutyrate ni de l'isovalérate. Ces données confirment que les voies mécanistiques impliquées en curatif et en préventif sont différentes, au moins en partie. Le butyrate, l'acétate et le propionate participent à l'amélioration de la stéatose hépatique soit par activation des récepteurs GPR41 et GPR43 situés au sein des tissus cibles (tissu adipeux, intestin, foie), soit directement en agissant localement sans liaison à leur récepteur.⁵² En curatif, le brunissement du TA semble plus prononcé qu'en préventif tout comme l'amélioration de la stéatose hépatique. Cela pourrait être corrélé aux modifications des SCFAs observées chez ces souris. En revanche, on ne retrouve pas de potentialisation de l'oxydation des AGs au sein du TA contrairement à ce qui est observé lors de l'utilisation préventive de la FMT. Là encore, il est possible que le temps de traitement soit trop court pour induire un changement du métabolisme des lipides au sein du TA. On note en revanche une diminution des marqueurs de l'inflammation au sein de ce tissu. Le MI modifié par la pectine semble donc avoir une action importante sur les lésions induites par le régime HFD, bien que l'ensemble des paramètres ne soient pas restaurés.

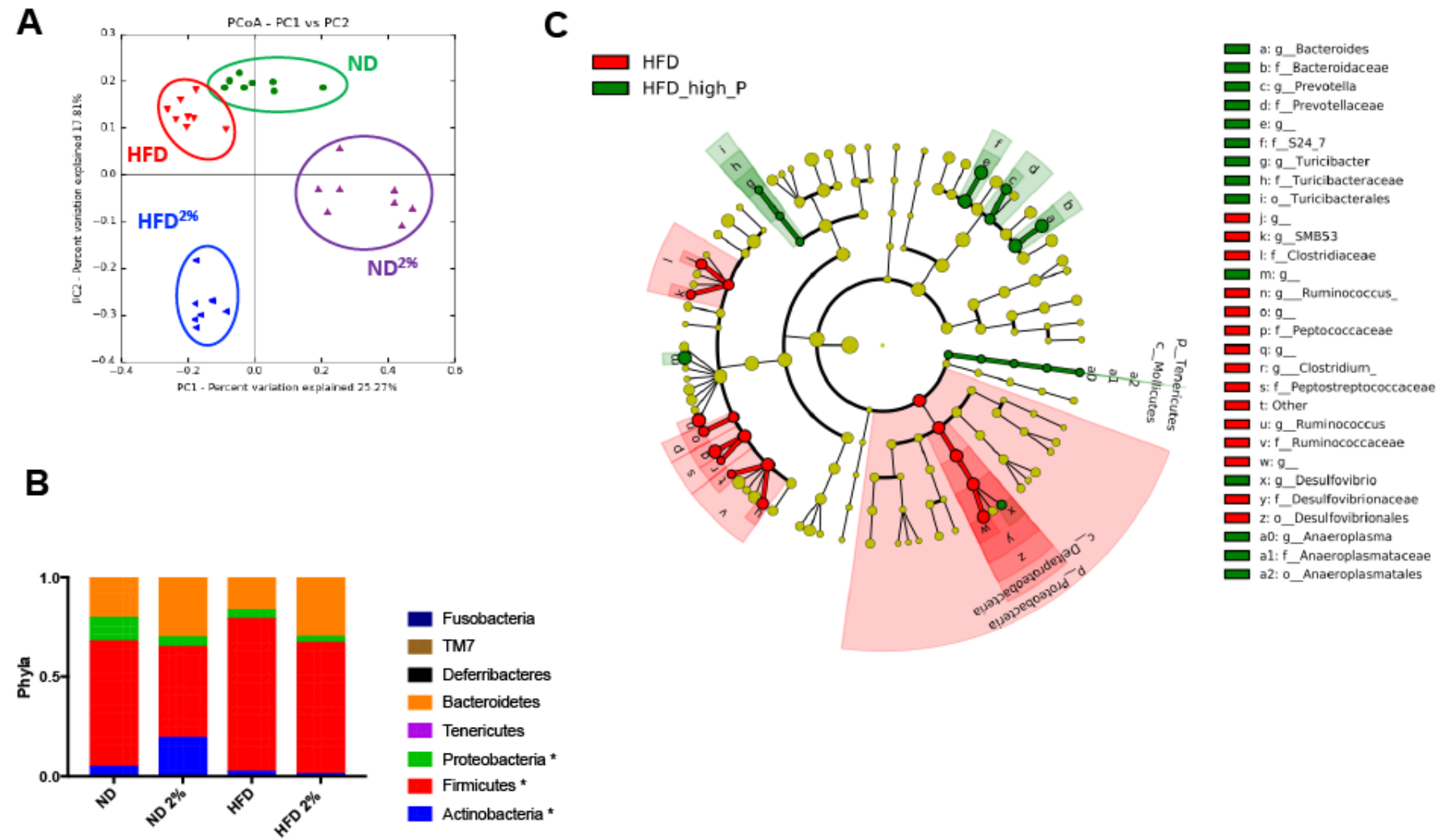
L'ensemble de nos observations converge vers les données de la littérature quant au rôle bénéfique de la pectine dans les altérations engendrées par un régime riche en graisses. La pectine utilisée en préventif modifie suffisamment le MI pour induire une production protectrice de métabolites. Nous faisons l'hypothèse que les SCFAs sont des médiateurs importants des effets bénéfiques de la pectine. Ces effets bénéfiques font intervenir les tissus adipeux et en particulier le TA dont le remodelage structurel et le brunissement modifient ses fonctions métaboliques. Nous avons également prouvé qu'une partie des effets de la pectine est transmissible par le MI modifié par celle-ci. Si la FMT ne permet pas de véritable atténuation de la stéatose hépatique, elle induit un brunissement du TA et une augmentation de la β -oxydation des AGs. La FMT exerce ses effets aussi bien en préventif qu'en curatif, contrairement à la pectine. Ceci suggère que la perturbation du MI induite par une FMT permet un remodelage plus efficace de l'écosystème bactérien que la consommation directe de la fibre elle-même lorsque le régime alimentaire n'est pas modifié.

Figure 1: Pectin improves liver injury in high fat diet fed mice



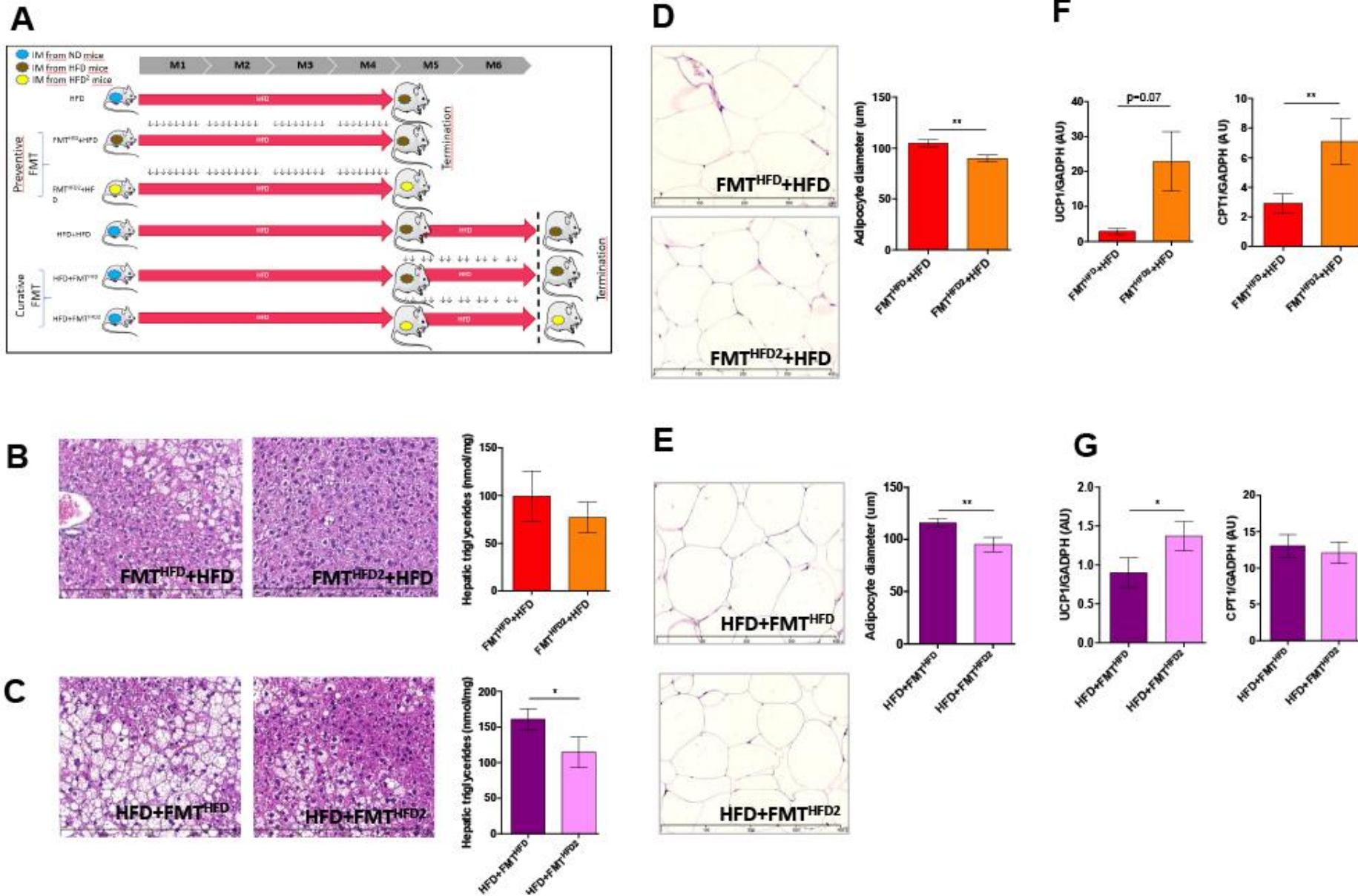
RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Figure 2: Modifications of the intestinal microbiota by high fat diet and pectin 2%



RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Figure 3: FMT from mice fed with pectin HFD is sufficient to induce browning of WAT in HFD fed mice



RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Figure 4: Curative and preventive FMT induced modification of IM composition and SCFAs

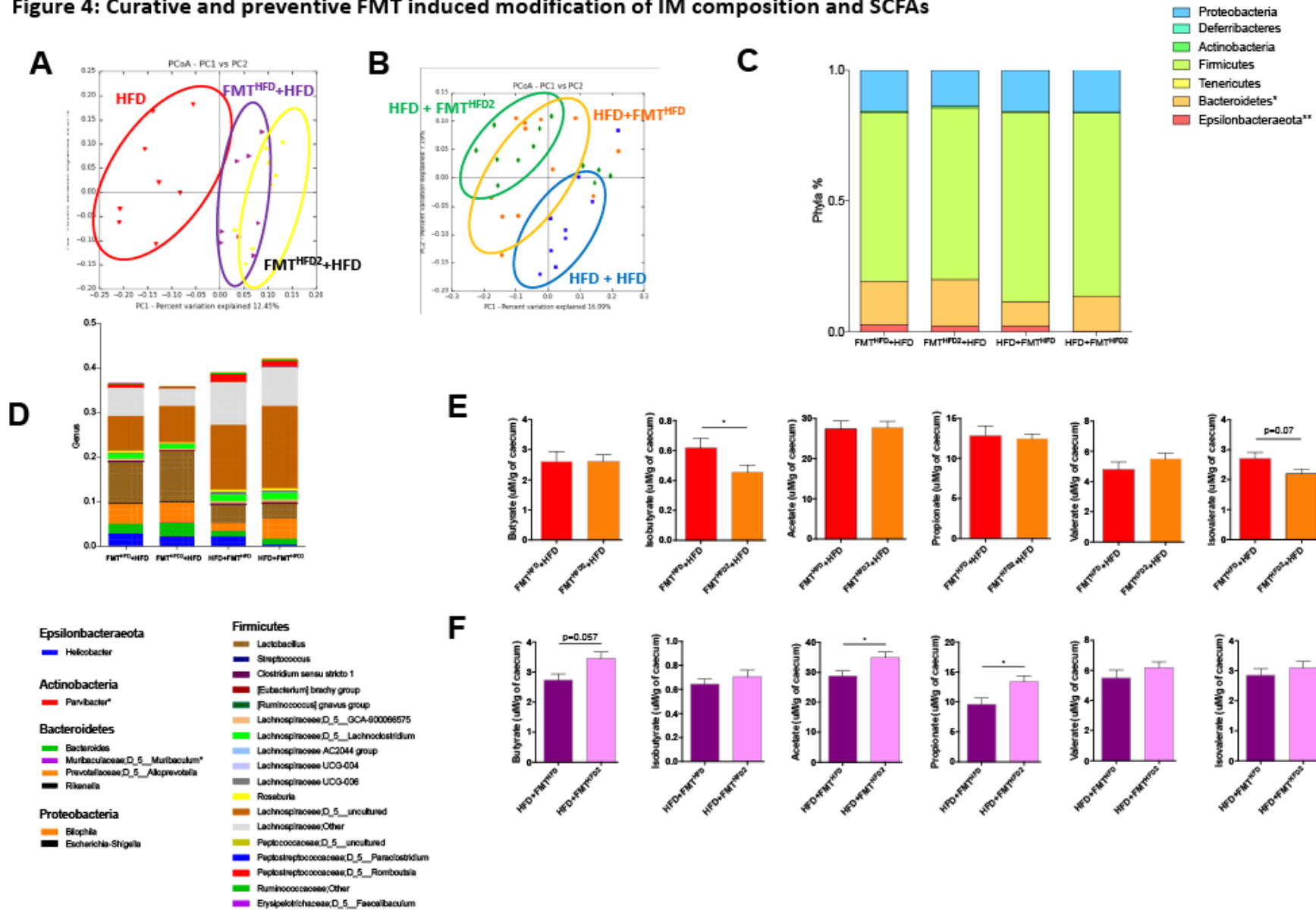


Figure 5: Addition of pectin in the HFD diet of obese mice is not sufficient to improve liver injury but induces browning of WAT

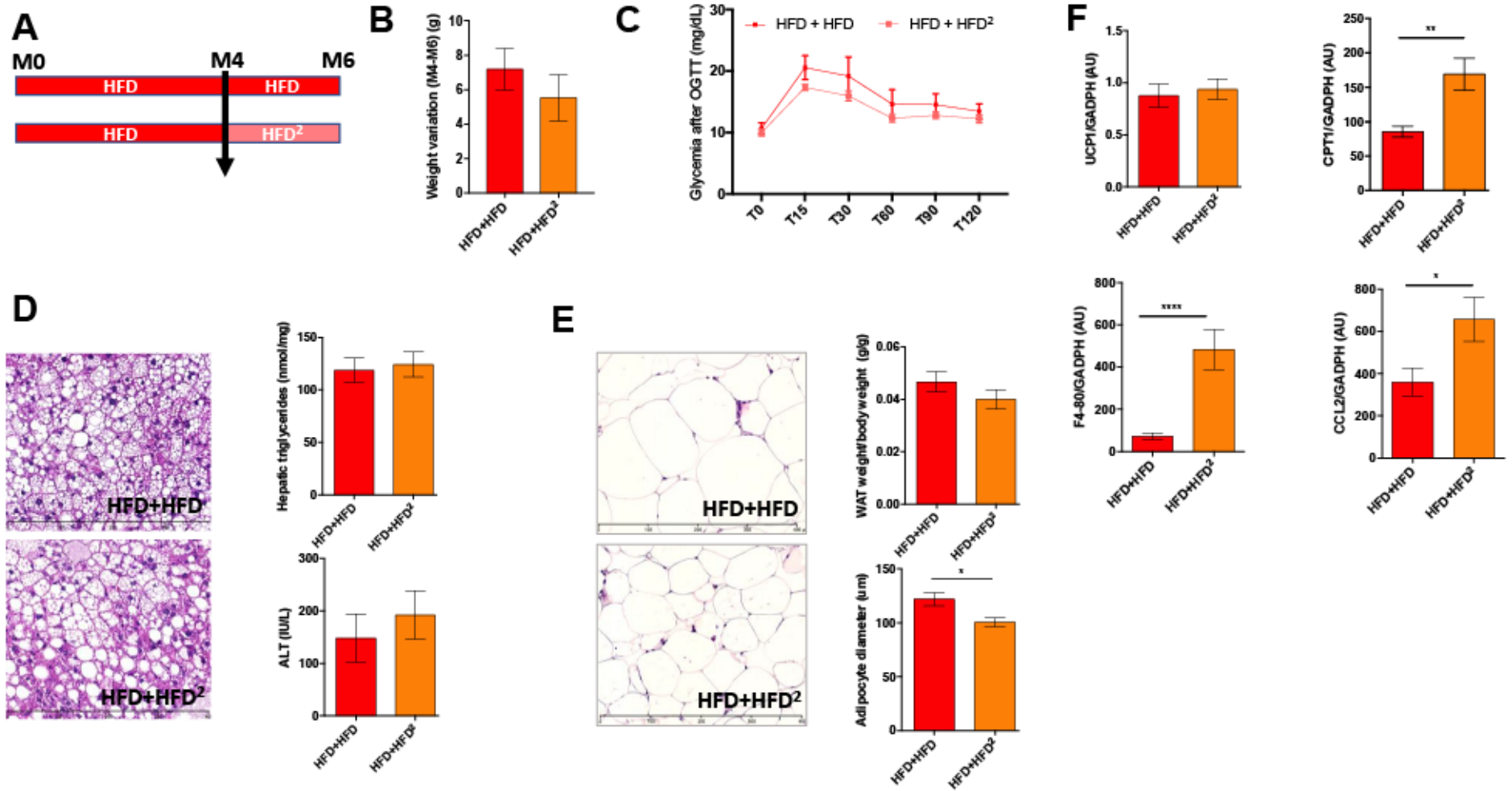
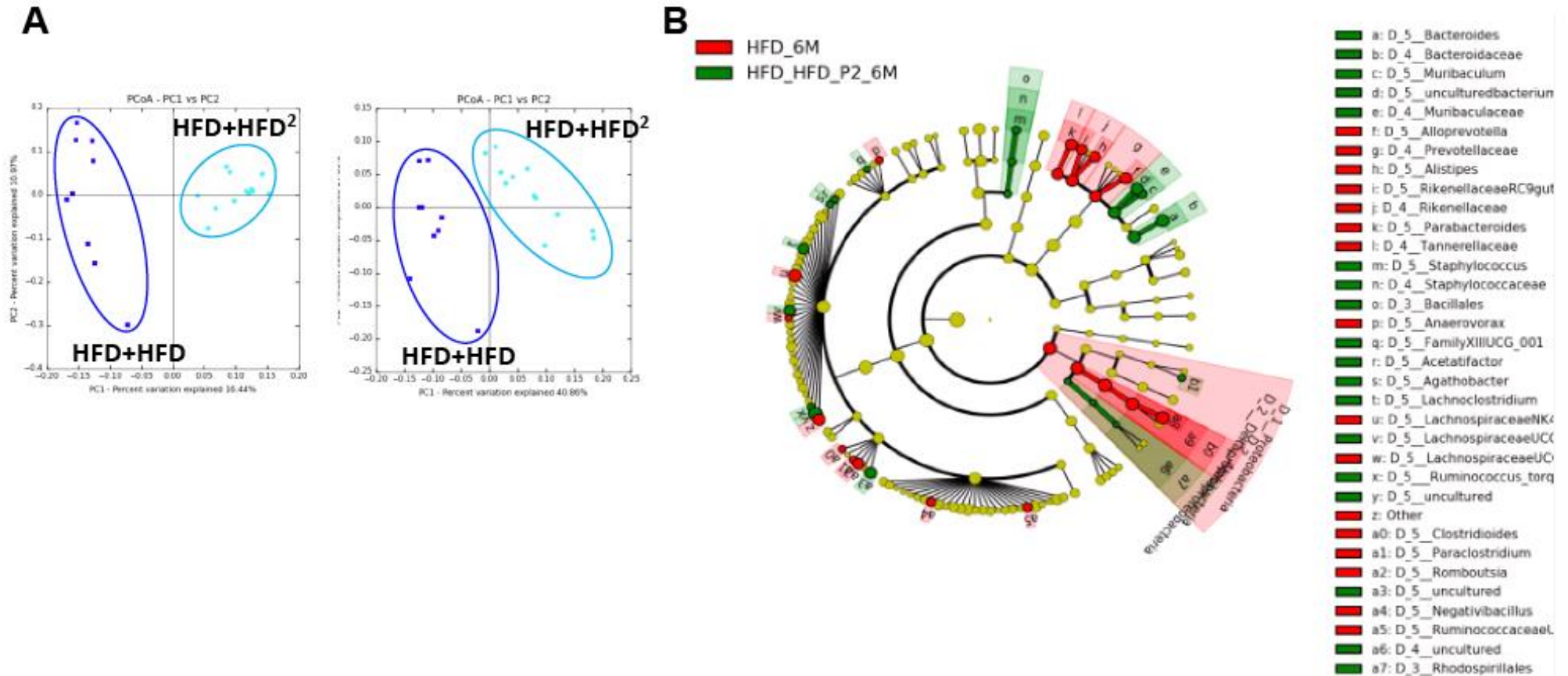
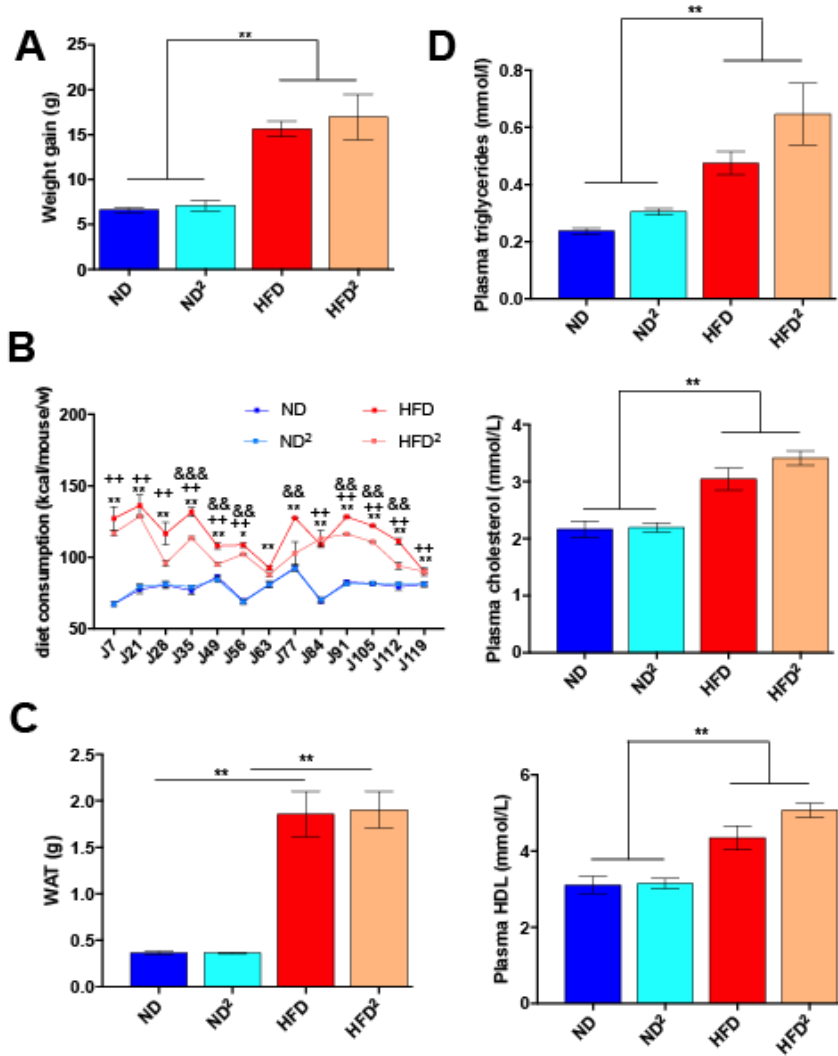


Figure 6: Modification of IM following pectin supplementation to HFD



RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

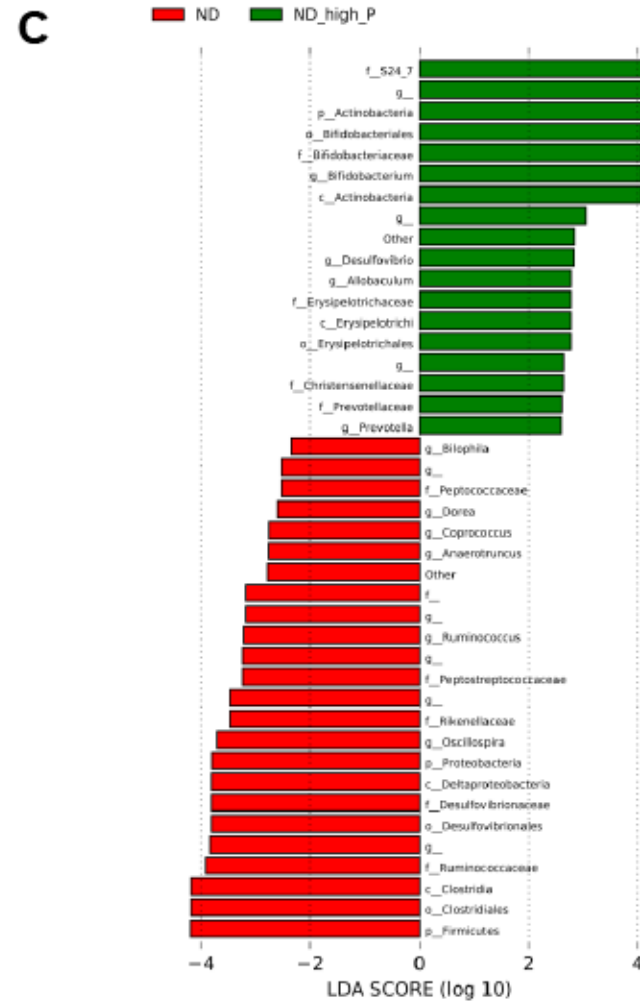
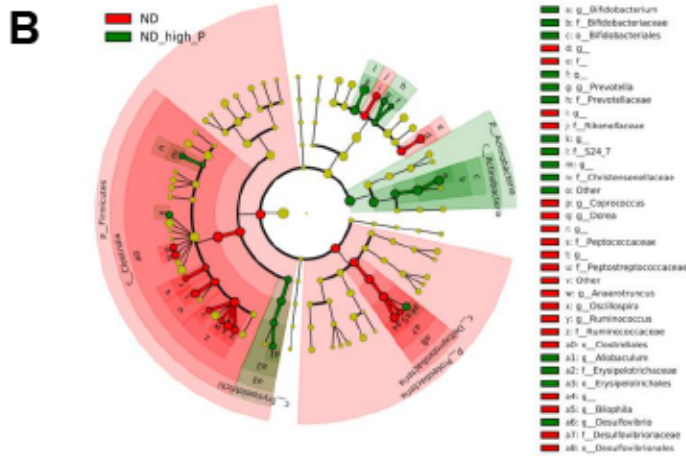
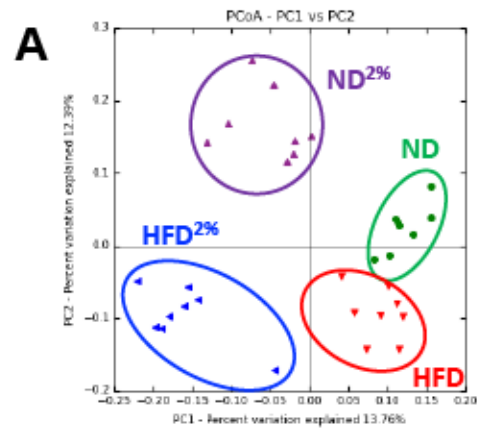
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1: Effect of pectin in normal diet and high fat diet fed mice
Mice were fed with normal diet (ND), ND with pectin 2% (ND²), high fat diet (HFD) and HFD with pectin 2% (HFD²) diets for 16 weeks. **(A)** Total body weight gain. **(B)** Diet consumption throughout the 16 weeks. **(C)** Epididymal white adipose tissue weight. **(D)** Fasting plasma triglycerides, HDL-cholesterol and total cholesterol. **(E)** White adipose tissue sections of ND or ND² mice stained with hematoxylin-eosin (scale 400 μm) and histomorphometric analysis of adipocyte diameter. **(F)** Brown adipose tissue section stained with hematoxylin-eosin (scale 400 μm). Data represent the mean±SEM of 6 mice, *: p<0.05, **: p<0.01. Data with different superscript symbols are different according to the following legends: *ND vs HFD; + HFD² vs ND² and & HFD vs HFD².

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

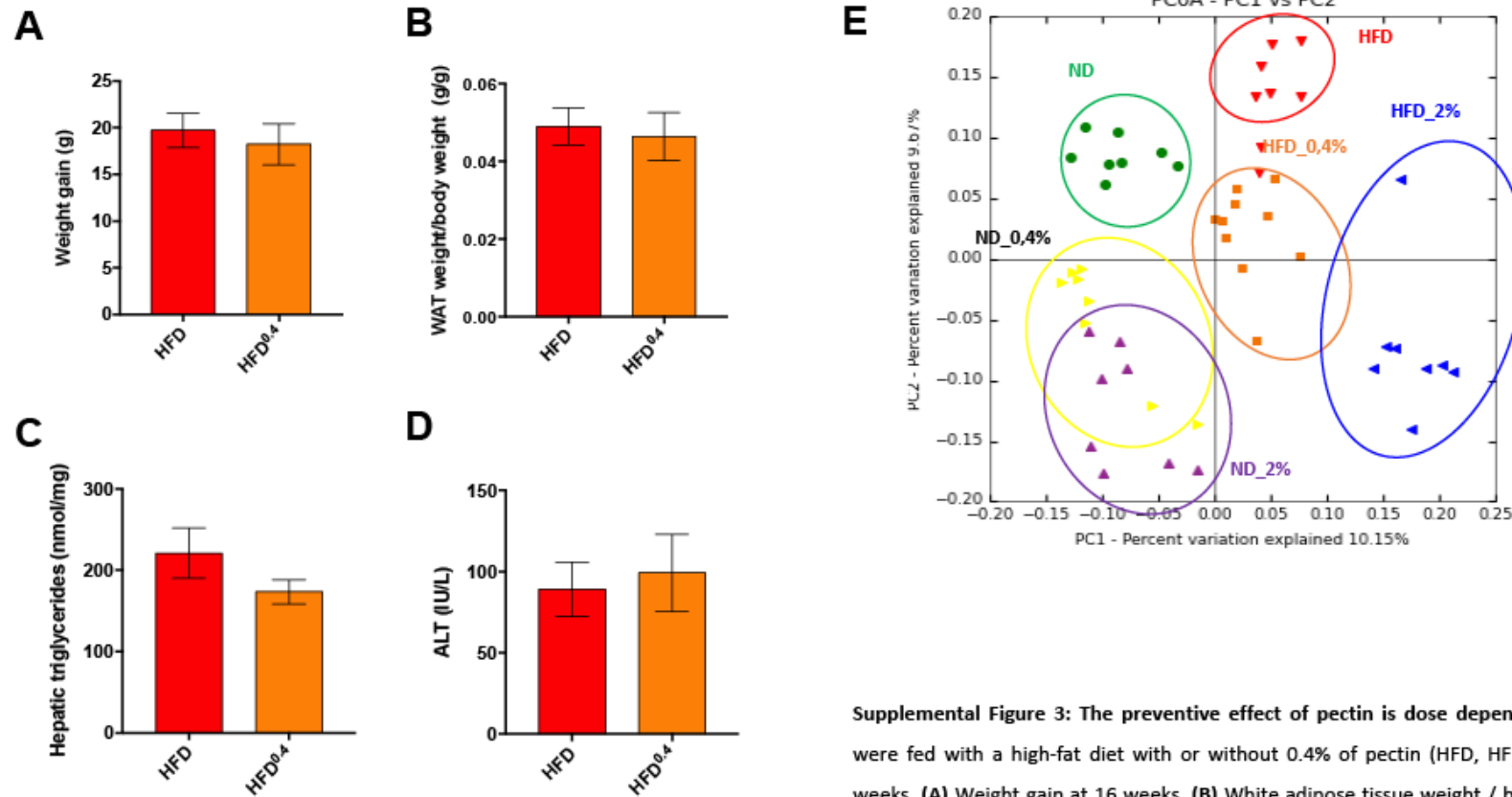
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2: Modifications of the intestinal microbiota by pectin in normal diet fed mice.

Mice were fed with a normal diet without or with pectin 2% (ND, ND²) for 16 weeks or with a high-fat diet with or without pectin (HFD, HFD²) for 16 weeks. **(A)** Weighted UniFrac distances distances showing a difference in the abundance of Operational Taxonomic Unit (OTU) of fecal microbiota between groups ($p < 0.001$); green = ND, purple = ND²; red= HFD and blue= HFD². **(B)** LDA effect size (LEfSe) cladograms showing the taxa most differentially associated with ND (red) or ND² (green) (Wilcoxon rank-sum test). Circle sizes in the cladogram plot are proportional to bacterial abundance. The circles represent, going from the inner to outer circle: phyla, genus, class, order, and family. **(C)** Plot showing the relative abundance of the taxa that were different between ND and ND² mice.

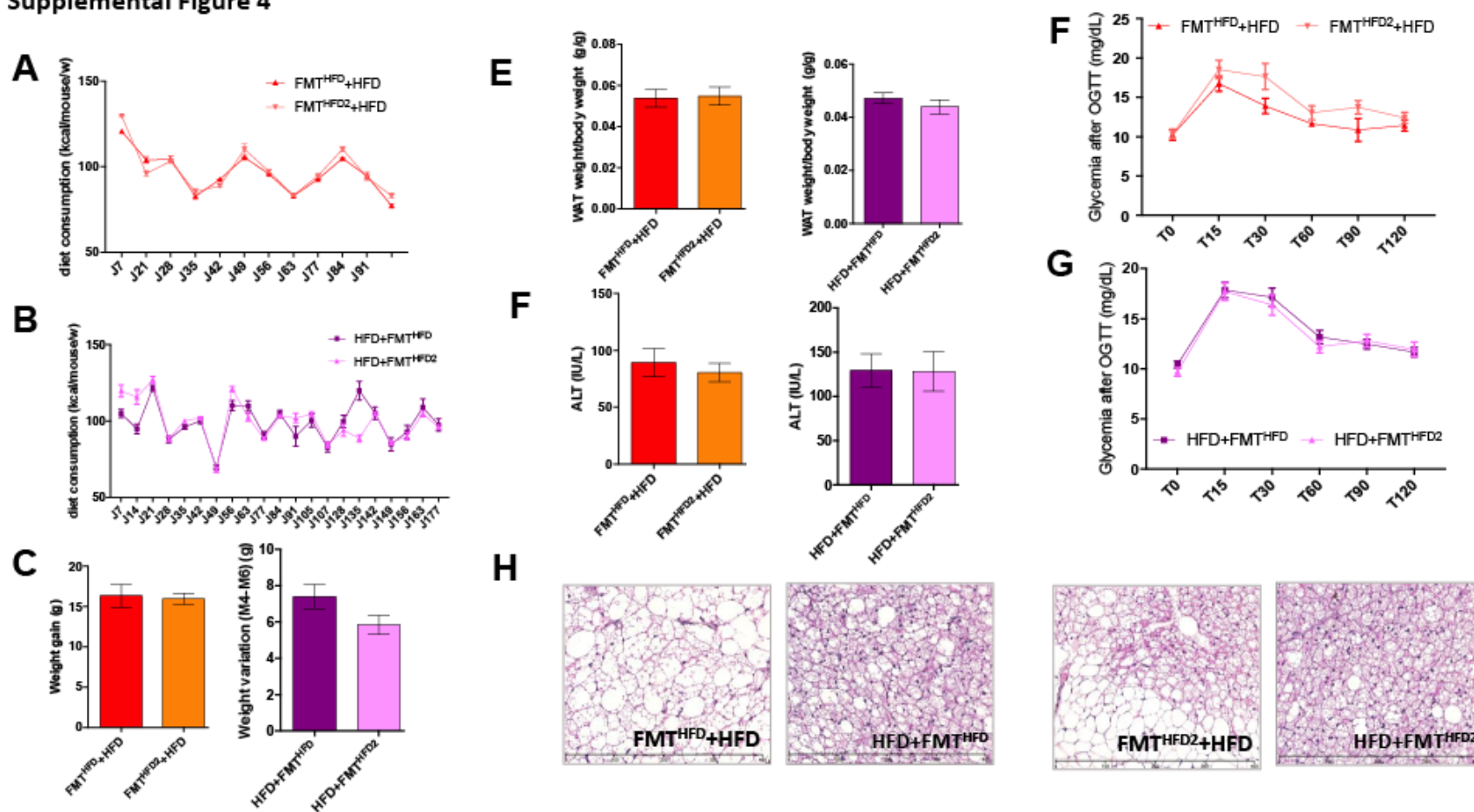
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 3: The preventive effect of pectin is dose dependant (Mice were fed with a high-fat diet with or without 0.4% of pectin (HFD, HFD^{0.4}) for 16 weeks. (A) Weight gain at 16 weeks. (B) White adipose tissue weight / body weight ratio. (C) Hepatic triglycerides content. (D) Plasma ALT. (E) Unweighted UniFrac distances showing differences of the intestinal microbiota composition even with a low dose of pectin; green=ND, yellow=ND^{0.4}, purple=ND², red=HFD, orange= HFD^{0.4}, blue= HFD². Data represent the mean±SEM of 8 mice.

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

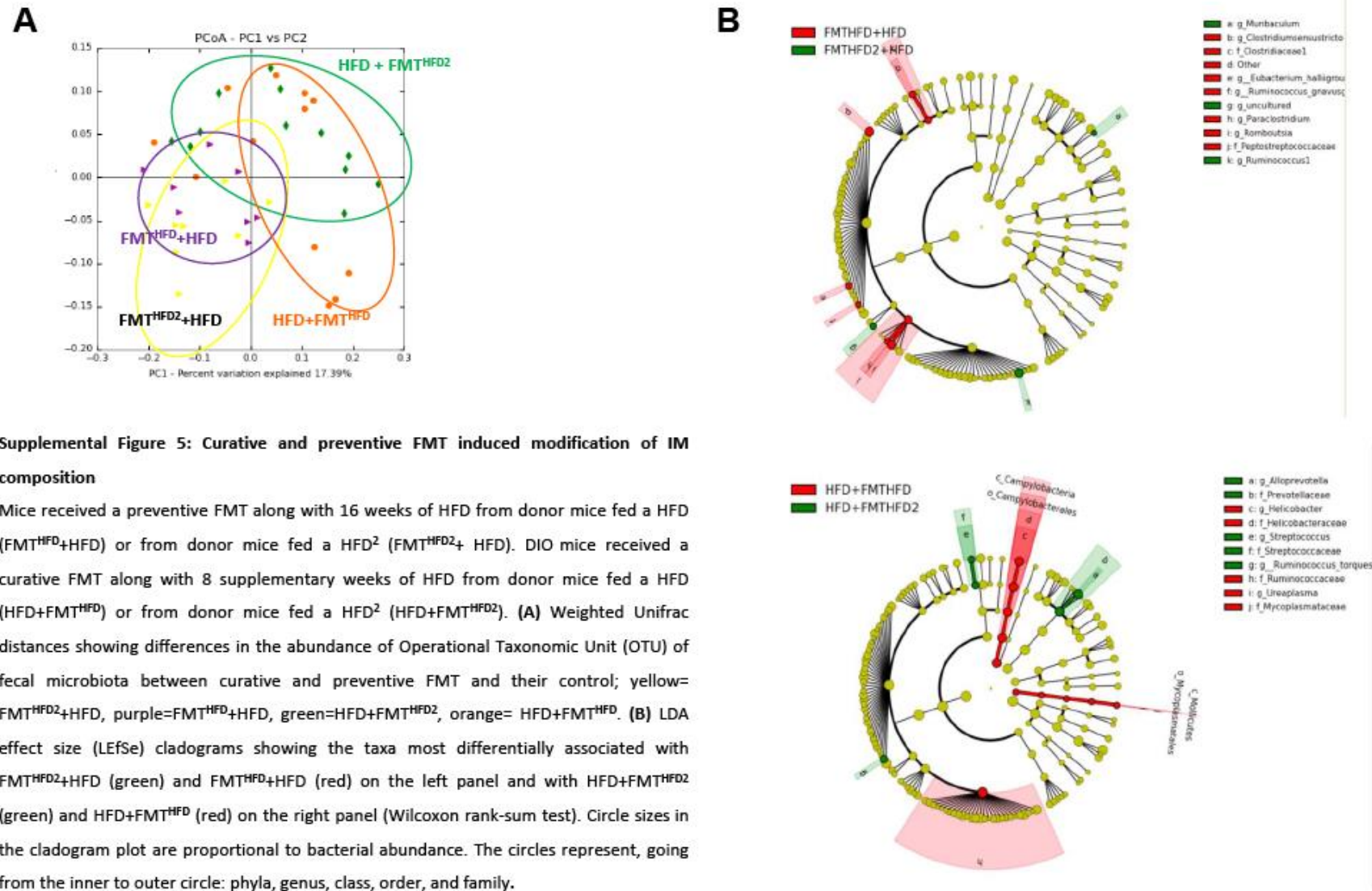
Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4: FMT from mice fed with pectin HFD is sufficient to induce browning of WAT in HFD fed mice

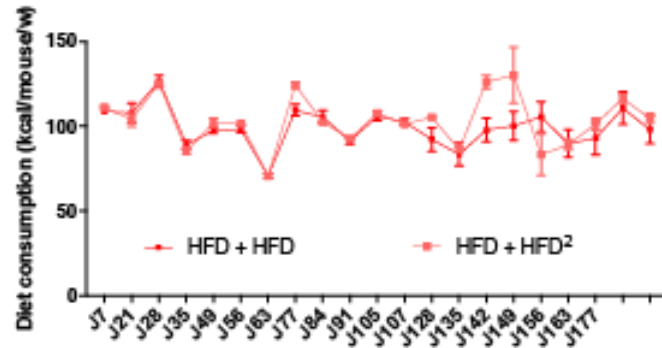
Mice received a preventive FMT along with 16 weeks of HFD from donor mice fed a HFD (FMT^{HFD}+HFD) or from donor mice fed a HFD² (FMT^{HFD2}+HFD). DIO mice received a curative FMT during 8 supplementary weeks of HFD from donor mice fed a HFD (HFD+FMT^{HFD}) or from donor mice fed a HFD² (HFD+FMT^{HFD2}). (A) 16 weeks evolution of diet consumption of mice fed with HFD and receiving FMT as preventive treatment. (B) 24 weeks evolution of diet consumption of mice fed with HFD and receiving from 16 weeks to 24 weeks FMT as curative treatment. (C) Weight gain of FMT^{HFD}+HFD or FMT^{HFD2}+HFD mice (left panel) and weight variation between 16 and 24 weeks of HFD+FMT^{HFD} or HFD+FMT^{HFD2} mice (right panel). (D) White adipose tissue weight/body weight ratio in FMT^{HFD}+HFD or FMT^{HFD2}+HFD mice (left panel) and of HFD+FMT^{HFD} or HFD+FMT^{HFD2} mice (right panel). (E) Plasma ALT in FMT^{HFD}+HFD or FMT^{HFD2}+HFD mice (left panel) and of HFD+FMT^{HFD} or HFD+FMT^{HFD2} mice (right panel). (F) Curves of glycemia after an oral glucose tolerance test in FMT^{HFD}+HFD or FMT^{HFD2}+HFD mice at 16 weeks and (G) in HFD+FMT^{HFD} or HFD+FMT^{HFD2} mice at 24 weeks. (H) Brown adipose tissue sections stained with hematoxylin-eosin (scale 400 μ m). Data represent the mean \pm SEM of 8 mice.

Supplemental Figure 5

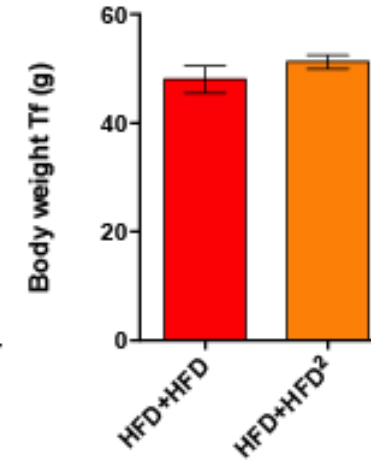
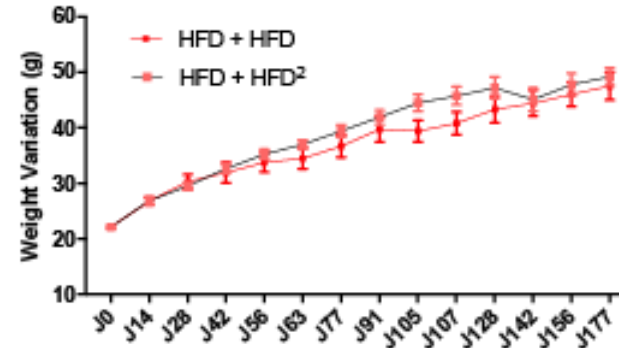


Supplemental Figure 6

A



B



Supplemental figure 6: Addition of pectin in the HFD diet of obese mice

Mice were fed with HFD for 16 weeks and received pectin supplementation (2%) from week 16 to week 24 as curative treatment (HFD+HFD²) compared to mice who did not received pectin (HFD+HFD). (A) Evolution of diet consumption during the 24 weeks of diet. (B) Weight variation and total body weight after 24 weeks of diet. (C) Liver weight/body weight ratio. Data represent the mean±SEM of 8 mice.

RESULTATS – Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

Legends of figures

Figure 1: Pectin improves liver injury in high fat diet fed mice

Mice were fed with normal diet (ND), ND with pectin 2% (ND²), high fat diet (HFD) and HFD with pectin 2% (HFD²) diets during 16 weeks. **(A)** Liver weight / body weight ratio. **(B)** Hepatic triglycerides content and histological examination of liver tissue section stained with Hematoxylin-eosin (scale 800 µm). **(C)** Plasma ALT and liver mRNA quantification of CCL2 and IL1β by RT-qPCR **(D)** White adipose tissue weight/body weight ratio. **(E)** White adipose tissue section stained with hematoxylin-eosin (scale 400µm) and histomorphometric analysis of adipocyte diameter (µm). **(F)** Curves of glycemia after an oral glucose tolerance test. * ND vs HFD et ND2 vs HFD2. Data represent the mean±SEM of 6 mice, *: p<0.05, **: p<0.01.

Figure 2: Modifications of the intestinal microbiota by high fat diet and pectin 2%.

Mice were fed with a normal diet without or with pectin 2% (ND, ND²) or fed with a high fat diet without or with pectin 2% (HFD, HFD²). Microbiota analysis were performed after 16 weeks of diet by 16S sequencing. **(A)** Unweighted Unifrac distances showing a difference in the composition of fecal microbiota between groups ($p < 0.001$, $R = 0.58$, ANOSIM test, 10,000 permutations, using the first 5 PC); green = ND, purple = ND²; red= HFD and blue= HFD² **(B)** Histogram showing the relative abundance between phyla (Bonferonni $p < 0.05$). **(C)** LDA effect size (LEfSe) cladogram showing the taxa most differentially associated with HFD (red) or HFD² (green) (Wilcoxon rank-sum test). Circle sizes in the cladogram plot are proportional to bacterial abundance. The circles represent, going from the inner to outer circle: phyla, genus, class, order, and family.

Figure 3: FMT from mice fed with pectin HFD is sufficient to induce browning of WAT in HFD fed mice

Mice received a preventive FMT before 16 weeks of HFD from donor mice fed a HFD (FMT^{HFD}+HFD) or from donor mice fed a HFD² (FMT^{HFD2}+ HFD). DIO mice received a curative FMT before 8 supplementary weeks of HFD from donor mice fed a HFD (HFD+FMT^{HFD}) or from donor mice fed a HFD² (HFD+FMT^{HFD2}). **(A)** Experimental setup showing the preventive and curative fecal microbiota transplant (FMT) in HFD fed mice. Preventive FMT were performed simultaneously with HFD and twice a week during 16 weeks of HFD. FMT^{HFD}+HFD mice

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

received the IM of mice fed a HFD and FMT^{HFD2}+HFD mice received the IM of mice fed a HFD². Curative FMT were performed after 16 weeks of HFD and twice a week during 8 weeks of HFD. HFD+FMT^{HFD} mice received the IM of mice fed a HFD and HFD+FMT^{HFD2} mice received the IM of mice fed a HFD². **(B to G)** Data in mice fed with HFD and receiving FMT as preventive or curative treatment. **(B and C)** Histological pictures of liver tissue section stained with Hematoxylin-eosin (scale 400 µm) and hepatic triglycerides content. **(D and E)** White adipose tissue section stained with hematoxylin-eosin (scale 400 µm) and histomorphometric analysis of adipocyte diameter (µm). **(F and G)** Quantification by RT-qPCR of mRNA expression of UCP1, CPT1, F4/80 and CCL2 in white adipose tissue. Data represent the mean±SEM of 8 mice, *: p<0.05, **: p<0.01.

Figure 4: Curative and preventive FMT induced modification of IM composition and SCFAs proportions in caecal content

Mice received a preventive FMT before 16 weeks of HFD from donor mice fed a HFD (FMT^{HFD}+HFD) or from donor mice fed a HFD² (FMT^{HFD2}+ HFD). DIO mice received a curative FMT before 8 supplementary weeks of HFD from donor mice fed a HFD (HFD+FMT^{HFD}) or from donor mice fed a HFD² (HFD+FMT^{HFD2}). **(A)** Unweighted Unifrac distances showing differences in IM composition between the groups; red= HFD (4 month of diet), yellow= FMT^{HFD2}+HFD, purple=FMT^{HFD}+HFD (p=0.01). **(B)** Unweighted Unifrac distances showing differences in IM composition between the groups; blue= HFD (6 months of diet), green= HFD+FMT^{HFD2}, orange= HFD+FMT^{HFD}; (p=0.08). **(C)** Relative abundance of bacteria at phyla's level. **(D)** Relative abundance of bacteria at genus's. **(E)** Specific changes in SCFAs caecal content induced by preventive FMT (µM/mg of caecal content) or **(F)** a curative FMT. Data represent the mean±SEM of 8 mice, *: p<0.05, **: p<0.01.

Figure 5: Addition of pectin in the HFD diet of obese mice is not sufficient to improve liver injury but induces browning of WAT

Mice were fed with HFD for 16 weeks and received pectin supplementation (2%) from week 16 to week 24 as curative treatment (HFD+HFD²) compared to mice who did not received pectin (HFD+HFD). **(A)** Experimental design showing the introduction of pectin in the diet as a curative diet. **(B)** Body weight variation between 16 weeks (M4) and 24 weeks (M6). **(C)** Curves

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

of glycemia after an oral glucose tolerance test at 24 weeks. **(D)** Histological pictures of liver tissue section stained with Hematoxylin-eosin (scale 400 μm), hepatic triglycerides content and plasma ALT. **(E)** White adipose tissue section stained with hematoxylin-eosin (scale 400 μm), white adipose tissue weight/body weight ratio and histomorphometric analysis of adipocyte diameter (μm). **(F)** Quantification of mRNA expression by RT-qPCR of UCP1, CPT1 in white adipose tissue. Data represent the mean \pm SEM of 8 mice, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

Figure 6: Modification of IM following pectin supplementation to HFD

Mice were fed with HFD for 16 weeks and received pectin supplementation (2%) from week 16 to week 24 as curative treatment (HFD+HFD²) compared to mice not receiving pectin (HFD+HFD). **(A)** Unweighted (left; $p=0.02$) and weighted (right; $p=0.01$) Unifrac distances showing differences regarding IM composition and relative OTU abundance between HFD+HFD (dark blue) and HFD+HFD² (light blue). **(B)** LDA effect size (LEfSe) cladogram showing the taxa most differentially associated with HFD+HFD (red) or HFD+HFD² (green) mice (Wilcoxon rank-sum test). Circle sizes in the cladogram plot are proportional to bacterial abundance. The circles represent, going from the inner to outer circle: phyla, genus, class, order, and family. Data represent the analysis of MI in 9 or 12 mice.

REFERENCES

1. Friedman, S. L.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Rinella, M.; Sanyal, A. J., Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **2018**, *24* (7), 908-922.
2. Canfora, E. E.; Meex, R. C. R.; Venema, K.; Blaak, E. E., Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol* **2019**, *15* (5), 261-273.
3. Le Roy, T.; Llopis, M.; Lepage, P.; Bruneau, A.; Rabot, S.; Bevilacqua, C.; Martin, P.; Philippe, C.; Walker, F.; Bado, A.; Perlemuter, G.; Cassard-Doulcier, A. M.; Gerard, P., Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **2013**, *62* (12), 1787-94.
4. Aron-Wisniewsky, J.; Vigliotti, C.; Witjes, J.; Le, P.; Holleboom, A. G.; Verheij, J.; Nieuwdorp, M.; Clement, K., Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17* (5), 279-297.
5. Zmora, N.; Suez, J.; Elinav, E., You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16* (1), 35-56.
6. Butel, M. J.; Waligora-Dupriet, A. J.; Wydau-Dematteis, S., The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis* **2018**, *9* (6), 590-597.
7. Zimmermann, P.; Curtis, N., The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review. *J. Infect.* **2019**, *79* (6), 471-489.
8. Sonnenburg, E. D.; Sonnenburg, J. L., Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab* **2014**, *20* (5), 779-786.
9. Vangay, P.; Johnson, A. J.; Ward, T. L.; Al-Ghalith, G. A.; Shields-Cutler, R. R.; Hillmann, B. M.; Lucas, S. K.; Beura, L. K.; Thompson, E. A.; Till, L. M.; Batres, R.; Paw, B.; Pergament, S. L.; Saenyakul, P.; Xiong, M.; Kim, A. D.; Kim, G.; Masopust, D.; Martens, E. C.; Angkurawaranon, C.; McGready, R.; Kashyap, P. C.; Culhane-Pera, K. A.; Knights, D., US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell* **2018**, *175* (4), 962-972 e10.
10. Tilg, H.; Zmora, N.; Adolph, T. E.; Elinav, E., The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20* (1), 40-54.
11. Koh, A.; De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Backhed, F., From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **2016**, *165* (6), 1332-1345.
12. Caesar, R.; Tremaroli, V.; Kovatcheva-Datchary, P.; Cani, P. D.; Backhed, F., Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab* **2015**, *22* (4), 658-68.
13. Makki, K.; Deehan, E. C.; Walter, J.; Backhed, F., The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, *23* (6), 705-715.
14. Li, W.; Zhang, K.; Yang, H., Pectin Alleviates High Fat (Lard) Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice: Possible Role of Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Regulated by Pectin. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (30), 8015-8025.
15. Shtriker, M. G.; Peri, I.; Taieb, E.; Nyska, A.; Tirosh, O.; Madar, Z., Galactomannan More than Pectin Exacerbates Liver Injury in Mice Fed with High-Fat, High-Cholesterol Diet. *Mol Nutr Food Res* **2018**, *62* (20), e1800331.
16. Weitkunat, K.; Stuhlmann, C.; Postel, A.; Rumberger, S.; Fankhanel, M.;

- Woting, A.; Petzke, K. J.; Gohlke, S.; Schulz, T. J.; Blaut, M.; Klaus, S.; Schumann, S., Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 6109.
17. Ferrere, G.; Wrzosek, L.; Cailleux, F.; Turpin, W.; Puchois, V.; Spatz, M.; Ciocan, D.; Rainteau, D.; Humbert, L.; Hugot, C.; Gaudin, F.; Noordine, M. L.; Robert, V.; Berrebi, D.; Thomas, M.; Naveau, S.; Perlemuter, G.; Cassard, A. M., Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice. *J. Hepatol.* **2017**, *66* (4), 806-815.
18. Wrzosek, L.; Ciocan, D.; Borentain, P.; Spatz, M.; Puchois, V.; Hugot, C.; Ferrere, G.; Robert, V.; Mayeur, C.; Perlemuter, G.; Cassard, A. M., Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci Rep* **2018**, *in press*.
19. DeSantis, T. Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E. L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G. L., Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (7), 5069-72.
20. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W. S.; Huttenhower, C., Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* **2011**, *12* (6), R60.
21. Wrzosek, L.; Ciocan, D.; Borentain, P.; Spatz, M.; Puchois, V.; Hugot, C.; Ferrere, G.; Mayeur, C.; Perlemuter, G.; Cassard, A. M., Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 6854.
22. Aron-Wisnewsky, J.; Vigliotti, C.; Witjes, J.; Le, P.; Holleboom, A. G.; Verheij, J.; Nieuwdorp, M.; Clément, K., Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17* (5), 279-297.
23. Le Roy, T.; Llopis, M.; Lepage, P.; Bruneau, A.; Rabot, S.; Bevilacqua, C.; Martin, P.; Philippe, C.; Walker, F.; Bado, A.; Perlemuter, G.; Cassard-Doulier, A. M.; Gérard, P., Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **2013**, *62* (12), 1787-94.
24. Tsilingiri, K.; Rescigno, M., Postbiotics: what else? *Benef Microbes* **2013**, *4* (1), 101-7.
25. Reynés, B.; Palou, M.; Rodríguez, A. M.; Palou, A., Regulation of Adaptive Thermogenesis and Browning by Prebiotics and Postbiotics. *Front Physiol* **2018**, *9*, 1908.
26. do Carmo, M. M.; Walker, J. C.; Novello, D.; Caselato, V. M.; Sgarbieri, V. C.; Ouwehand, A. C.; Andreollo, N. A.; Hiane, P. A.; Dos Santos, E. F., Polydextrose: Physiological Function, and Effects on Health. *Nutrients* **2016**, *8* (9).
27. Bindels, L. B.; Delzenne, N. M.; Cani, P. D.; Walter, J., Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2015**, *12* (5), 303-10.
28. Endo, H.; Niioka, M.; Kobayashi, N.; Tanaka, M.; Watanabe, T., Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: new insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e63388.
29. Bray, J. K.; Chiu, G. S.; McNeil, L. K.; Moon, M. L.; Wall, R.; Towers, A. E.; Freund, G. G., Switching from a high-fat cellulose diet to a high-fat pectin diet reverses certain obesity-related morbidities. *Nutr Metab (Lond)* **2018**, *15*, 55.
30. Palou, M.; Sánchez, J.; García-Carrizo, F.; Palou, A.; Picó, C., Pectin supplementation in rats mitigates age-related impairment in insulin and leptin sensitivity independently of reducing food intake. *Mol Nutr Food Res* **2015**, *59* (10), 2022-33.

31. Li, T.; Li, S.; Dong, Y.; Zhu, R.; Liu, Y., Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. *Food Chem* **2014**, *145*, 335-41.
32. Krzysiek, M.; Grajeta, H.; Prescha, A.; Weber, R., Effect of cellulose, pectin and chromium(III) on lipid and carbohydrate metabolism in rats. *J Trace Elem Med Biol* **2011**, *25* (2), 97-102.
33. Jiang, T.; Gao, X.; Wu, C.; Tian, F.; Lei, Q.; Bi, J.; Xie, B.; Wang, H. Y.; Chen, S.; Wang, X., Apple-Derived Pectin Modulates Gut Microbiota, Improves Gut Barrier Function, and Attenuates Metabolic Endotoxemia in Rats with Diet-Induced Obesity. *Nutrients* **2016**, *8* (3), 126.
34. Skinner, R. C.; Warren, D. C.; Lateef, S. N.; Benedito, V. A.; Tou, J. C., Apple Pomace Consumption Favorably Alters Hepatic Lipid Metabolism in Young Female Sprague-Dawley Rats Fed a Western Diet. *Nutrients* **2018**, *10* (12).
35. Drew, J. E.; Reichardt, N.; Williams, L. M.; Mayer, C. D.; Walker, A. W.; Farquharson, A. J.; Kastora, S.; Farquharson, F.; Milligan, G.; Morrison, D. J.; Preston, T.; Flint, H. J.; Louis, P., Dietary fibers inhibit obesity in mice, but host responses in the cecum and liver appear unrelated to fiber-specific changes in cecal bacterial taxonomic composition. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 15566.
36. Safari, Z.; Monnoye, M.; Abuja, P. M.; Mariadassou, M.; Kashofer, K.; Gérard, P.; Zatloukal, K., Steatosis and gut microbiota dysbiosis induced by high-fat diet are reversed by 1-week chow diet administration. *Nutr Res* **2019**, *71*, 72-88.
37. Takahashi, K.; Nishida, A.; Fujimoto, T.; Fujii, M.; Shioya, M.; Imaeda, H.; Inatomi, O.; Bamba, S.; Sugimoto, M.; Andoh, A., Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* **2016**, *93* (1), 59-65.
38. Takahashi, Y.; Sugimoto, K.; Inui, H.; Fukusato, T., Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (13), 3777-85.
39. Moreno-Navarrete, J. M.; Fernandez-Real, J. M., The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. *Rev Endocr Metab Disord* **2019**, *20* (4), 387-397.
40. Bäckhed, F.; Manchester, J. K.; Semenkovich, C. F.; Gordon, J. I., Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (3), 979-84.
41. Backhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L. V.; Koh, G. Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C. F.; Gordon, J. I., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (44), 15718-23.
42. Mestdagh, R.; Dumas, M. E.; Rezzi, S.; Kochhar, S.; Holmes, E.; Claus, S. P.; Nicholson, J. K., Gut microbiota modulate the metabolism of brown adipose tissue in mice. *J Proteome Res* **2012**, *11* (2), 620-30.
43. den Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D. J.; Bakker, B. M., The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* **2013**, *54* (9), 2325-40.
44. Wu, J.; Chen, M.; Shi, S.; Wang, H.; Li, N.; Su, J.; Liu, R.; Huang, Z.; Jin, H.; Ji, X.; Wang, S., Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ db/db mice. *Carbohydr Polym* **2017**, *178*, 209-220.
45. Newgard, C. B., Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab* **2012**, *15* (5), 606-14.
46. den Besten, G.; Havinga, R.; Bleeker, A.; Rao, S.; Gerding, A.; van

RESULTATS - Lien entre microbiote et pectine dans la prévention et le traitement de la NAFLD chez les souris obèses

Houron et al. Gut microbiota contributes to the beneficial effects of pectin on NAFLD

- Eunen, K.; Groen, A. K.; Reijngoud, D. J.; Bakker, B. M., The short-chain fatty acid uptake fluxes by mice on a guar gum supplemented diet associate with amelioration of major biomarkers of the metabolic syndrome. *PLoS One* **2014**, *9* (9), e107392.
47. den Besten, G.; Bleeker, A.; Gerding, A.; van Eunen, K.; Havinga, R.; van Dijk, T. H.; Oosterveer, M. H.; Jonker, J. W.; Groen, A. K.; Reijngoud, D. J.; Bakker, B. M., Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* **2015**, *64* (7), 2398-408.
48. Chambers, E. S.; Viardot, A.; Psichas, A.; Morrison, D. J.; Murphy, K. G.; Zac-Varghese, S. E.; MacDougall, K.; Preston, T.; Tedford, C.; Finlayson, G. S.; Blundell, J. E.; Bell, J. D.; Thomas, E. L.; Mt-Isa, S.; Ashby, D.; Gibson, G. R.; Kolida, S.; Dhillo, W. S.; Bloom, S. R.; Morley, W.; Clegg, S.; Frost, G., Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* **2015**, *64* (11), 1744-54.
49. Sahuri-Arisoylu, M.; Brody, L. P.; Parkinson, J. R.; Parkes, H.; Navaratnam, N.; Miller, A. D.; Thomas, E. L.; Frost, G.; Bell, J. D., Reprogramming of hepatic fat accumulation and 'browning' of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes (Lond)* **2016**, *40* (6), 955-63.
50. Yamashita, H.; Maruta, H.; Jozuka, M.; Kimura, R.; Iwabuchi, H.; Yamato, M.; Saito, T.; Fujisawa, K.; Takahashi, Y.; Kimoto, M.; Hiemori, M.; Tsuji, H., Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, *73* (3), 570-6.
51. Al-Lahham, S. H.; Peppelenbosch, M. P.; Roelofsen, H.; Vonk, R. J.; Venema, K., Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1801* (11), 1175-83.
52. Canfora, E. E.; Jocken, J. W.; Blaak, E. E., Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* **2015**, *11* (10), 577-91.

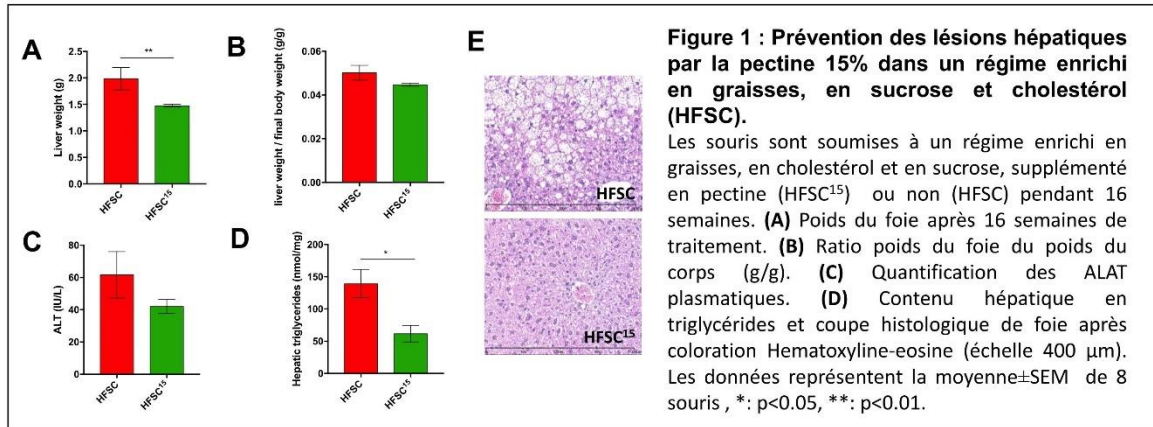
II. Résultats complémentaires : Impact de la pectine à haute dose sur les lésions hépatiques induites par un régime enrichi en graisse, en sucre et en cholestérol.

Les résultats obtenus en utilisant une faible dose de pectine permettent de préserver les rongeurs d'une partie des effets délétères induits par un régime HFD. A 2%, la pectine modifie le MI et l'administration par FMT de ce MI modifié est également capable d'améliorer, au moins en partie, les lésions induites par un régime gras. Cependant, les résultats mitigés notamment en utilisant la pectine à 2% en curatif suggèrent que les doses choisies pourraient être trop faibles pour permettre une résolution complète des altérations induites par le régime.

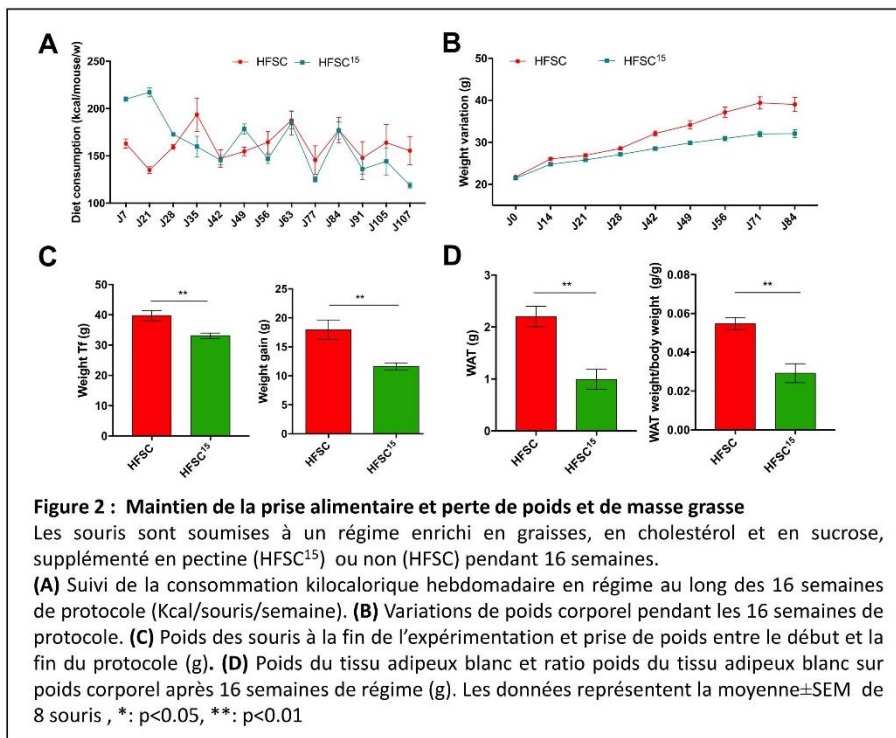
La dose de 2% de pectine correspond à une consommation d'environ 0,06 g de pectine pour 30 g de poids corporel soit une consommation de 10 g par jour chez l'homme. Dans ce nouveau protocole, nous avons opté pour une dose de 0,45 g de pectine pour 30 g de poids corporel ce qui équivaut à un régime à 15% de pectine. A ces doses, la transposition chez l'homme imposerait une consommation d'environ 70 g de pectine par jour. Cette condition excessive avait entre autre pour but d'induire des modifications plus significatives du MI afin d'identifier des bactéries potentiellement bénéfiques et les métabolites bactériens associés. Néanmoins, comme le métabolisme de l'homme et des rongeur n'est pas identique, il n'est pas certain que cette simple corrélation des doses soient pertinente en pour la pratique clinique. Par ailleurs, nous avons opté pour un régime étant également enrichi en sucre et en cholestérol afin de se rapprocher d'une alimentation occidentale type « western diet ».

Des souris mâles C57BL6 ont été mises sous régime high-fat, high-cholestérol et high sucrose (HFSC) pendant 16 semaines avec une supplémentation en pectine à 15% pour l'un des groupes. D'un point de vue énergétique, le contenu en graisses était de 34,7% et obtenu avec du lard comme pour nos régimes HFD. Le régime HFSC contenait 15% de sucrose et 1% de cholestérol. L'apport calorique était de 518,3 kcal/100g (HFSC) et 480,08 kcal/100g (HFSC +15%). Comme pour les expérimentations précédentes, la pectine utilisée était issue de la pomme (réf : P93854) et achetée chez Sigma-Aldrich (lot : BCBS3576 ; CAS number : 9000-69-5). Les régimes ont été préparés à façon par SNIFF (Allemagne). Les souris étaient pesées toutes les semaines et la consommation en régime mesurée pour chaque cage de 4 souris.

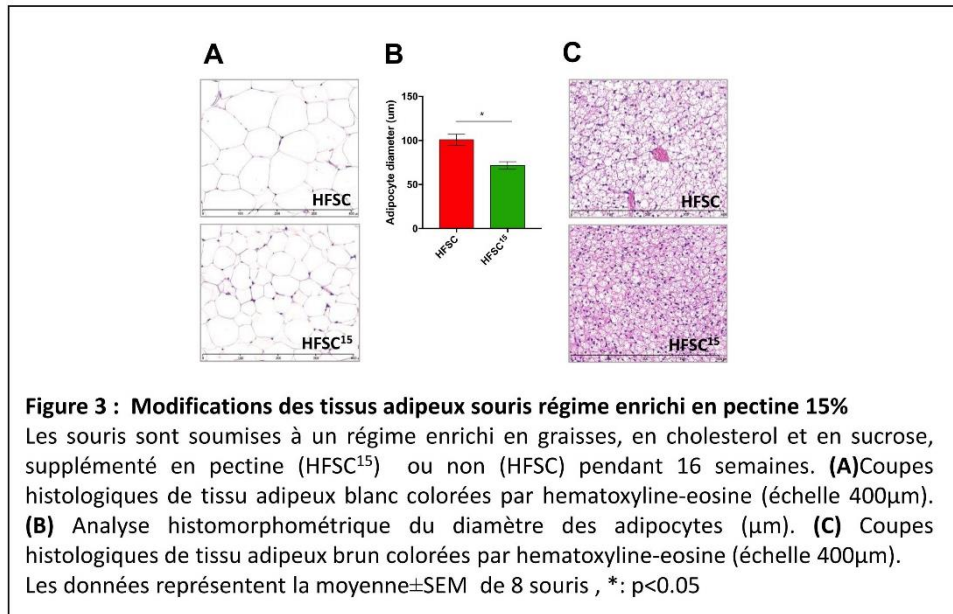
A forte dose, soit 15% de pectine, l'ensemble des lésions hépatiques induites par un régime délétère est amélioré (**Fig. 1**). En effet, aucune stéatose n'est détectable chez les souris recevant de la pectine à 15% et les ALT tendent à être diminuées par rapport aux souris sans traitement.



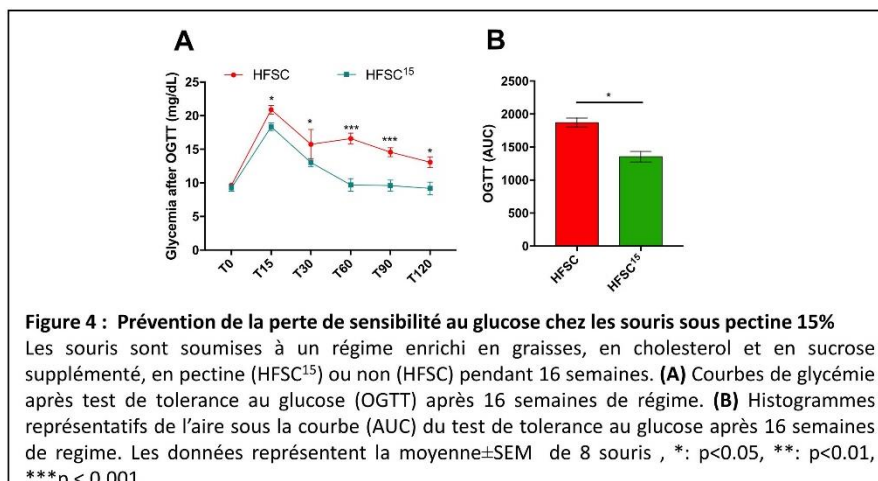
Cet effet protecteur n'est pas dû à une diminution de la prise alimentaire. En revanche, malgré une consommation calorifique identique, la prise de poids est atténuée avec diminution du taux de masse grasse (**Fig. 2**).



Le TA présente un aspect caractéristique de brunissement avec diminution franche du diamètre des adipocytes (**Fig.3**). La pectine modifie structurellement le BAT avec une réduction des macrogouttelettes de lipides remplacées par des microgouttelettes.

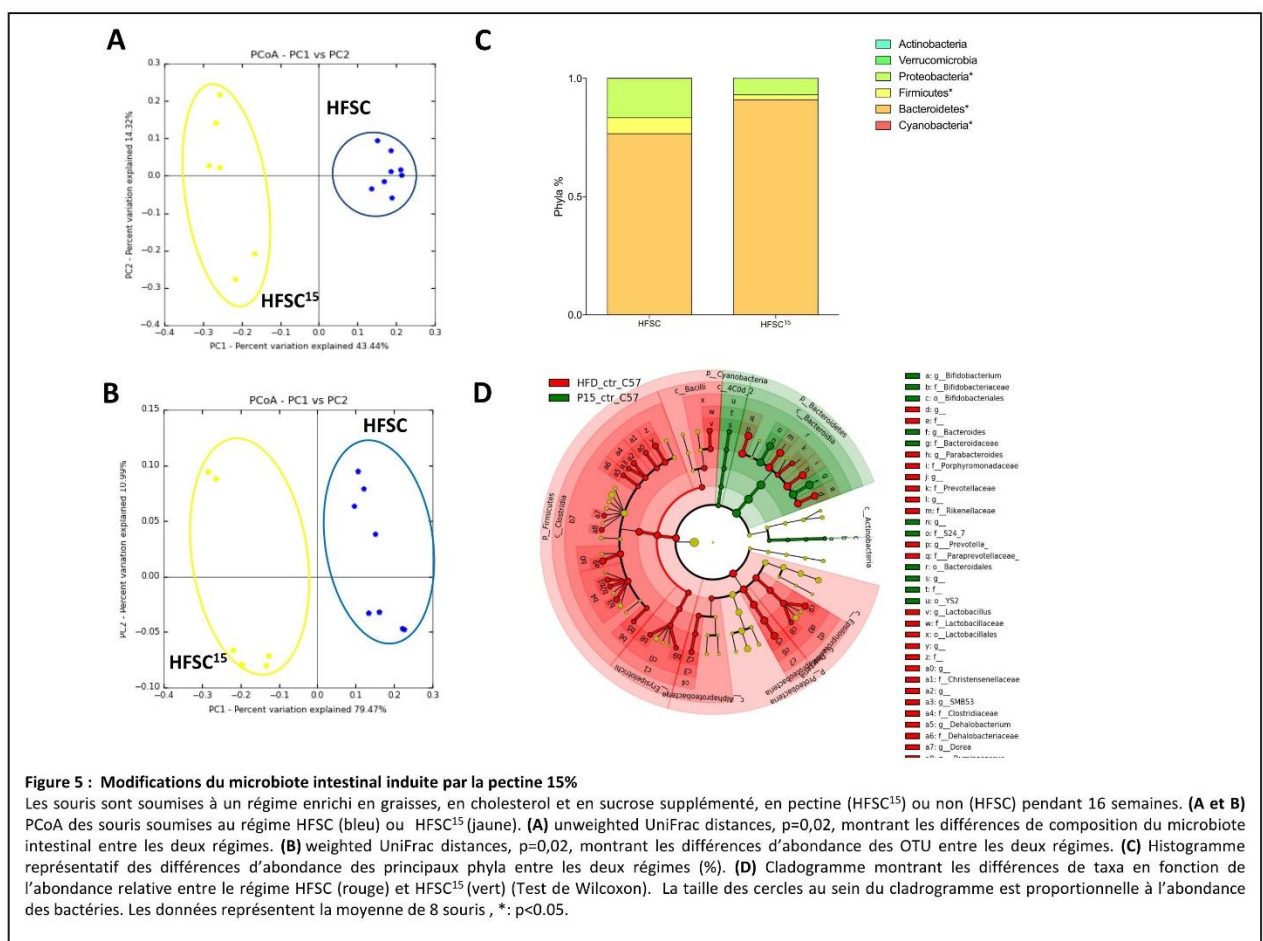


De manière intéressante, sous pectine 15%, la tolérance au glucose est préservée ce qui n'était pas le cas à des doses plus faibles de pectine (**Fig.4**). Ceci est cohérent avec la littérature sur le rôle de la pectine dans la régulation glycémique et sa capacité à absorber le glucose dans l'intestin³³⁹.

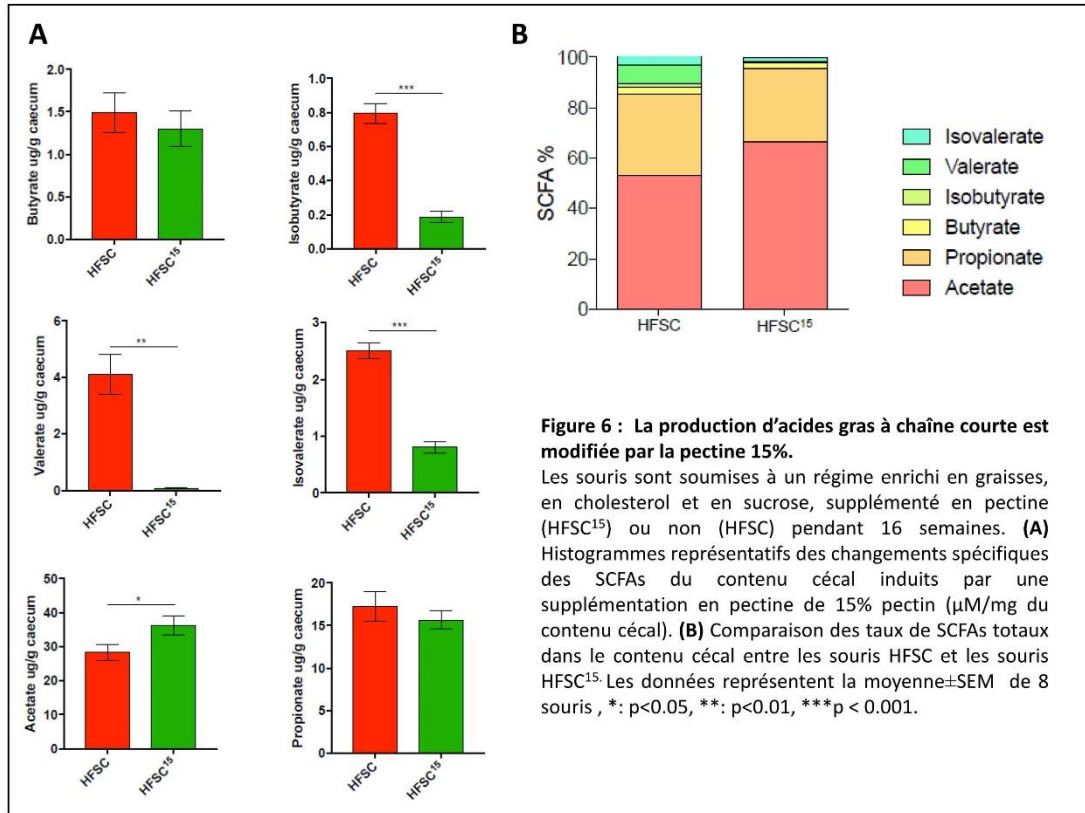


Des fortes doses de pectine induisent de nouvelles modifications du MI avec des différences majeures entre les régimes HFSC et HFSC15 (**Fig.5**). L'augmentation des Bacteroides est conservée et on observe de plus une diminution des Proteobacteria. La pectine à 15% induit

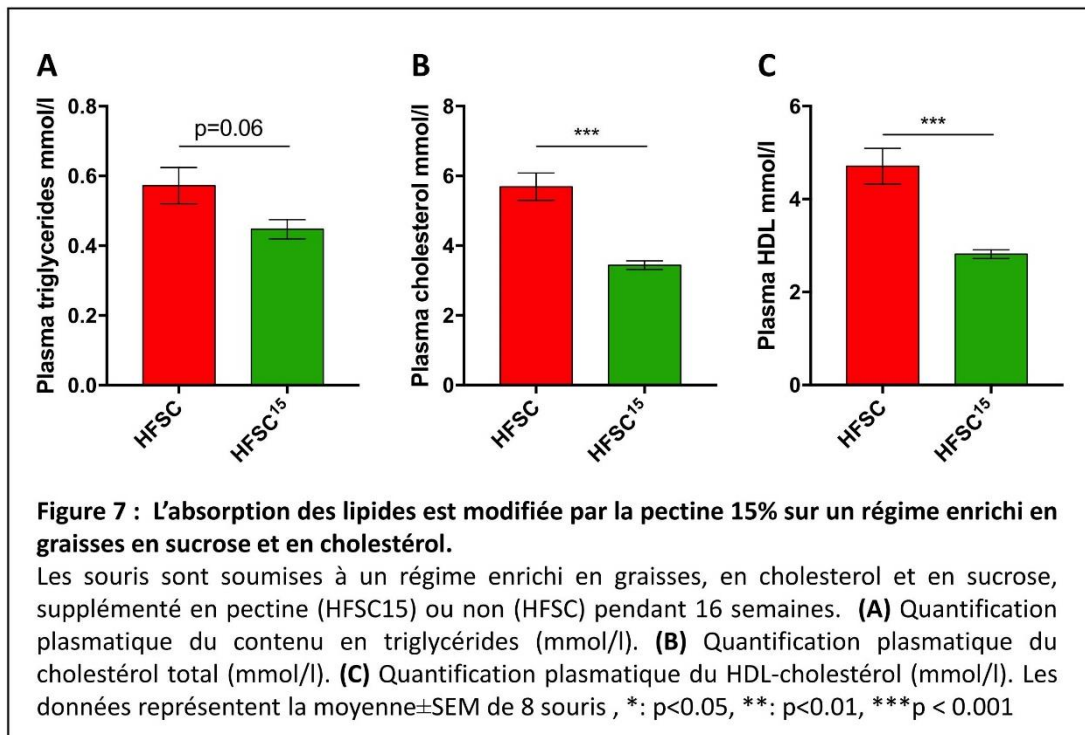
l'augmentation des Bacteroidales (dont Bacteroides) et des Bifidobacteriales (dont Bifidobacterium). En revanche, la pectine induit une diminution des Bacilli, des Epsilonproteobacteria, des Deltaproteobacteria, des Clostridia et des Erysipelotrichi. Parmi les bactéries dont la fréquence est diminuée par la pectine à forte dose, on note que les Protéobacteria, Erysipelotrichi, Parabacteroides, Dorea, Lactobacillus, Oscillospira. Ces espèces ont été décrites précédemment comme associées à la NAFLD/NASH³⁴⁰. On assiste également à une diminution d'Helicobacter lors du traitement par la pectine 15% qui comme nous l'avons vu précédemment est associée à la production de LPS et donc à une possible augmentation de l'endotoxémie.



Enfin, cette forte dose de pectine modifie également le contenu caecal en acides gras à chaîne courte. La pectine induit ainsi une diminution drastique du valérate, mais également de l'isobutyrate et de l'isovalérate (**Fig.6**). En revanche, on observe une augmentation de l'acétate.



La consommation de pectine 15% associée à un régime enrichi en cholestérol entraîne une modification de l'absorption lipidique. En effet, si les triglycérides sont peu touchés, le cholestérol et les HDL post prandiaux sont diminués (**Fig.7**). Cet effet est à lier directement aux propriétés physicochimiques de la pectine (cf. Chapitre 4, III, paragraphe C) qui la rende capable d'avoir un effet chélateur sur le cholestérol ou des molécules de type acides biliaires.



Ainsi, à la dose élevée de 15% de pectine dans un régime enrichi en graisse, en sucrose et en cholestérol, nous observons un effet plus homogène de la pectine sur l'ensemble des paramètres associés à la NAFLD sans diminution de l'apport alimentaire. Ces conditions devraient nous permettre d'identifier plus précisément les mécanismes par lesquels la pectine induit ses effets métaboliques.

III. Discussion de l'article et des données complémentaires

Bien que l'analyse des résultats ne soit pas achevée, les données complémentaires présentées dans cette dernière partie nous permettent d'étayer l'hypothèse qu'une supplémentation en pectine puisse avoir un intérêt réel dans la prise en charge de la NAFLD.

Une des difficultés des modèles rongeurs consiste en leurs capacités à mimer la pathologie humaine. Le modèle que nous avons le plus utilisé consiste en un régime enrichi en graisses (HFD). Ce modèle nous a permis de prouver que la pectine a un effet préventif sur l'apparition des lésions du foie impliquant des modifications du MI. Néanmoins, nous avons également utilisé un régime enrichi en sucrose, en graisses et en cholestérol, qui se rapproche plus de l'alimentation humaine de type occidentale. L'utilisation de la pectine dans ce régime met en avant son utilité non seulement en tant que fibre modulant le MI mais également sa capacité chélatrice des graisses de type cholestérol et acides biliaries. Il est à noter que dans le cadre de ces expériences, il serait intéressant de déterminer les variations des concentrations des acides biliaries compte tenu de leurs fonctions sur le métabolisme hépatique et la capacité de la pectine à augmenter leur excrétion.

En effet, les acides biliaries sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique de l'hôte via l'activation de FXR et TGR5 par l'intermédiaire du MI. Il a été montré que l'exposition au froid stimulait l'utilisation des lipoprotéines par le BAT et l'augmentation de la synthèse d'ABs à partir du cholestérol selon la voie de synthèse alternative des ABs impliquant CYP7B1. On retrouvait une augmentation des taux d'ABs fécaux et plasmatiques, par une activation du BAT et par une modulation importante de la composition du MI³⁴¹. Il se pourrait ainsi que de fortes doses de pectine aient un effet sur la composition en ABs notamment par une augmentation de leur excrétion.

Nous montrons que la pectine entraîne un remodelage structurel et fonctionnel des tissus adipeux qui semble participer à l'atténuation des lésions du foie induites par un régime gras. Ce effets sont plus importants à 15% qu'à 2% de pectine ce qui pourrait s'expliquer en partie par des modifications différentes de production de SCFAs suivant la dose de pectine administrée.

Chez l'homme, une revue menée par Bozetto et al. explique que chez les patients NAFLD, la supplémentation du régime alimentaire par différentes fibres est associée à une amélioration de la NAFLD. L'effet des fibres pourrait affecter positivement le contenu lipidique hépatique en diminuant l'absorption du glucose et la lipogenèse de novo ainsi qu'en modifiant la composition du MI¹⁴⁵. De plus cette revue met en avant le rôle des fibres dans la production des SCFAs entraînant une modification du WAT et du BAT¹⁴⁵.

Nous avons observé une amélioration de la tolérance au glucose avec une dose de pectine 15% mais pas de 2%. Là encore, il faut considérer non seulement que l'amélioration de la tolérance au glucose est liée à des modifications des SCFAs, mais également à une diminution de son absorption liée à la pectine elle-même.

En effet, les SCFA sont impliqués dans la production de GLP-1 par les cellules entérochromaffines intestinales. Cet effet s'exerce principalement par l'activation du GPR43 et dans une moindre mesure par celle du GPR41³⁴². Ces différents paramètres, GLP1 et expression des récepteurs GPR41 et GPR43 seront quantifiés dans nos expériences à 15% de pectine. En ce qui concerne l'effet de la pectine sur l'absorption du glucose, nous pourrions analyser au niveau intestinal l'expression de SGLT1 (sodium glucose transporter 1) et quantifier ainsi l'absorption du 2-deoxyglucose.³⁴³⁻³⁴⁵. Pour réellement conclure, il nous faudrait refaire des tests sur animaux vivants et mesurer les flux d'absorption du glucose.

L'utilisation de la pectine à 15% a également un effet sur la prise de poids, comme le révélait l'étude de Li et al. où la pectine de citron à 8% induisait une diminution de la masse corporelle et de la masse grasse sans modification de l'apport énergétique³³¹. Le maintien de la prise alimentaire suggère, là encore, une possible diminution de l'absorption des nutriments. Cette hypothèse pourrait être confirmée ou non par la quantification des calories et des lipides encore présents dans les fèces comme cela avait pu être fait par Li et al.³⁴⁶. Cette étude montrait que la pectine pouvait agir sur la perte de poids corporel lors d'un régime HFD via différents mécanismes :

La promotion de la dégradation des Ags via la β -oxydation mitochondriale dans le foie ;

L'interruption des voies biologiques impliquées dans la digestion et l'absorption des lipides, résultant en une augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol et une diminution des TG et du cholestérol plasmatiques.

A 15% de pectine, il est probable que ces deux mécanismes co-existent. Ils pourraient expliquer en partie la perte de poids et contribuer à l'amélioration de la stéatose par une diminution du flux de lipides arrivant au foie.

Les effets de la pectine à dose élevée dépendent donc de ses propriétés physico-chimiques mais également de sa capacité à modifier le MI et par la suite les métabolites bactériens produits dont les SCFAs. Outre leur effet sur l'amélioration de la tolérance au glucose, les SCFAs sont également capables d'agir sur le foie et le TA^{347, 348}.

Dans notre étude, la pectine exerce son action bénéfique, entre autres, en induisant le brunissement du WAT ce qui se traduit au niveau hépatique par une diminution de l'accumulation des TG. Ces observations sont compatibles avec les données sur l'effet bénéfiques des SCFAs sur des souris HFD²⁰⁸.

Le lien entre les fibres alimentaires, le brunissement du TA et l'activation du BAT soulève de nombreuses questions³⁴⁹. Ainsi, Weitkunat et al. a montré qu'une supplémentation en inuline chez des souris induisait une modification du MI et était associée à une amélioration du poids corporel et de la masse grasse avec brunissement du TA³⁵⁰. L'inuline entraînait une augmentation des taux d'acétate et était associée au brunissement du TA et à une augmentation de la température corporelle. Plus généralement, de nombreuses études ont mis en évidence un lien étroit entre l'administration de SCFAs et le brunissement du TA chez les rongeurs. Moreno-Navarrete et al., ont ainsi montré une corrélation entre les taux d'acétate et de propionate, l'abondance relative en Firmicutes et le brunissement du TA³⁵¹. Gao et al. et Li et al. ont décrit une relation entre une supplémentation en butyrate et l'activation du BAT avec augmentation de la thermogénèse, de la β -oxydation et de l'expression d'UCP1^{352, 353}. D'autres études attestent de la contribution de l'acétate dans la thermogénèse et le brunissement du TA^{209, 349}. Enfin, il a été montré qu'une supplémentation en pectine hautement estérifiée à des rats permettait de prévenir les atteintes métaboliques liées à une restriction calorique pendant la gestation par l'intermédiaire du MI et la production de SCFAs, en particulier de l'acétate³⁵⁴. Dans cette étude, les effets bénéfiques de la pectine étaient liés à l'activation du BAT et au brunissement du TA induits par l'acétate. Toutes ces données renforcent l'importance du MI et de ses métabolites sur l'homéostasie métabolique de l'hôte et sur son implication dans les pathologies métaboliques comme la NAFLD.

Les effets d'une faible dose de pectine restent limités sur la pathogenèse de la NAFLD et notre première hypothèse était d'évaluer l'effet préventif d'une telle dose de pectine dans l'amélioration de la NAFLD chez le rongeur. A 2%, nous avons été capables d'atténuer une partie des effets induits par un régime gras sans impact sur la prise de poids, le taux de masse grasse ou la tolérance au glucose. Nous avons confirmé par l'utilisation de hautes doses de pectine qu'il était possible de préserver l'ensemble de ces fonctions malgré un régime hautement délétère pour l'organisme. Les modifications du MI induites par une forte dose de pectine sont plus importantes que celles induites par une faible dose de pectine, tout comme la composition en SCFAs dans le caecum. On retrouve ainsi la diminution des BCFAs : l'isobutyrate et l'isovalérate. La fermentation protéique est donc atténuée à 15% de pectine et cela est associé à une amélioration de l'IR et des altérations métaboliques comme la prise de poids, le taux de masse grasse ainsi que la stéatose hépatique comme énoncé précédemment^{355, 356}. On observe également une augmentation de l'acétate qui, comme décrit précédemment, peut intervenir dans le brunissement du TA, dans l'activation du BAT et dans l'amélioration de la stéatose hépatique. Etonnamment on note une diminution importante du valérate. Ce dernier est corrélé à une amélioration de l'absorption du glucose au niveau adipocytaire via fixation sur GPR41 et donc induit une diminution de l'insulinorésistance³⁵⁷. A l'inverse, une diminution en valérate est associée à la pathogenèse de la NAFLD ce qui contraste avec l'amélioration des lésions observée dans notre modèle murin³⁵⁸. Ces données suggèrent donc l'existence d'un équilibre subtil entre les SCFAs permettant leur action bénéfique sur l'organisme.

Des études complémentaires restent nécessaires pour caractériser les SCFAs et les bactéries qui les produisent. Nos données sur la pectine à 15% devraient nous permettre d'étudier en détail les modifications du MI et de déterminer si il nous est possible de dégager des espèces bactériennes particulièrement impactées qui pourraient être testées comme probiotiques en complément du régime HFD.

Chez l'homme, il est important de noter que l'utilisation de hautes doses de pectine entraîne un inconfort digestif pouvant altérer l'observance du protocole voire engendrer des effets indésirables plus nocifs à long terme comme une inflammation de la muqueuse intestinale³⁵⁹. Se focaliser sur les modulations de l'écosystème bactérien et sur la compréhension des

RESULTATS COMPLEMENTAIRES : DISCUSSION

mécanismes liés aux métabolites comme les SCFAs pourrait donc être une des pistes thérapeutiques complémentaires à l'étude des bactéries elles-mêmes.

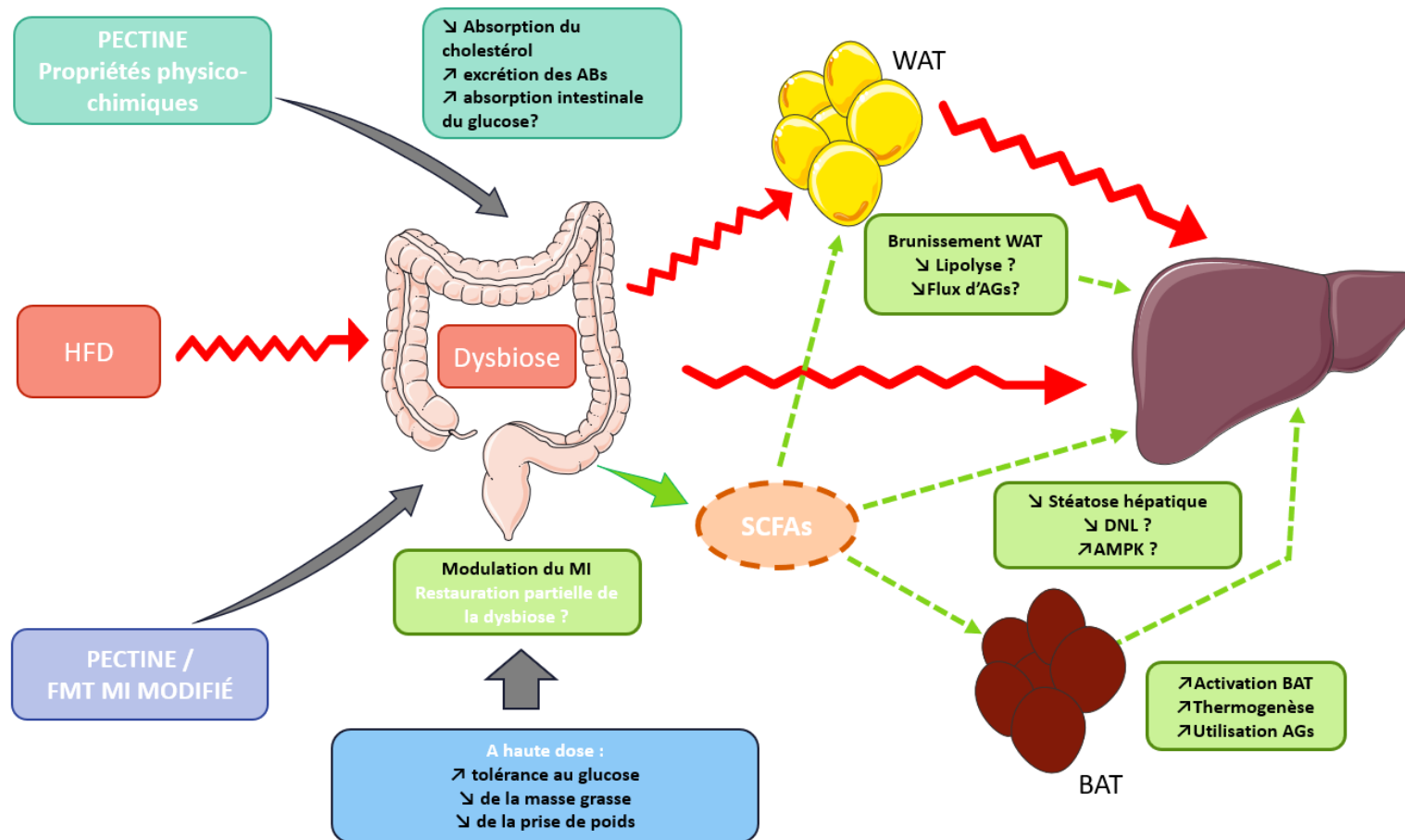


Figure Bilan : Rôle bénéfique de la pectine dans la NAFLD et interrelation entre le microbiote intestinal, les tissus adipeux et le foie.

Les effets délétères du régime HFD sur le foie passent en partie par le développement d'une dysbiose intestinale. Le microbiote intestinal participe au développement de la NAFLD via la production de métabolites dont les acides gras à chaîne courte (SCFAs). Le MI et le SCFAs agissent sur le tissu adipeux blanc (WAT) en favorisant son inflammation et sa croissance. Le WAT libère alors des quantités importantes d'acides gras vers le foie. Le MI et les SCFAs peuvent agir directement sur le foie et favoriser l'accumulation de triglycérides in situ par différents mécanismes biologiques.

Une supplémentation en pectine permet en fonction de la dose administrée de contrecarrer les effets du régime gras. Cette action est en partie liée à ses propriétés physico-chimiques et induit une diminution de l'absorption des lipides et notamment du cholestérol. Les effets bénéfiques de la pectine peuvent également découler de son influence positive sur la dysbiose et par voie de conséquences sur la modulation du profil de SCFAs. Le MI et les SCFAs agissent alors

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'effet bénéfique des fibres dans la NAFLD et les pathologies métaboliques prend de l'essor depuis quelques années. Parmi les fibres alimentaires étudiées, l'inuline, la gomme guar, les galacto-oligosaccharides (GOS) et les fructo-oligosaccharides (FOS) ont montré à l'instar de la pectine un potentiel thérapeutique dans l'amélioration du profil métabolique des rongeurs soumis à un régime HFD^{349, 360}. Ces composés ont fait l'objet de nombreuses études visant notamment à éclaircir leur rôle dans la modulation du MI et dans la production des métabolites bactériens comme les SCFAs^{360, 361}. Chung et al., ont ainsi montré qu'une supplémentation en inuline et en pectine *in vitro* à des fermentateurs inoculés par du MI humain induisait des modifications de composition du MI au niveau de l'espèce de manière sélective en fonction de la nature de la fibre administrée¹⁴³. Ces modifications étaient notamment associées à une modulation de la production des SCFAs. Une autre étude menée sur des rats soumis à un régime HFD (lard et cholestérol) permettait d'étudier l'effet de la pectine du citron ou de la gomme guar en fonction de leur degré de méthylation (pectine) et de viscosité (gomme guar)¹⁴⁴. Les différentes fibres étaient capables de diminuer l'adiposité et la prise de poids chez les rongeurs. En revanche, l'administration de chacune des fibres entraînait un profil spécifique de SCFAs et du MI, montrant les optimisations potentielles envisageables en fonction des propriétés chimiques des fibres utilisées. Ainsi, l'utilisation de gomme guar de viscosité moyenne était associée à un effet bifidogénique et à une production accrue de butyrate. Elle permettait une meilleure prévention de la stéatose hépatique. Une autre étude a montré que les fibres hautement fermentables contenues dans la myrtille permettaient d'améliorer la stéatose hépatique chez le rat soumis à un régime HFD. Cet effet était lié à une potentialisation de la production des SCFAs et notamment du butyrate en amont et pendant le développement de l'obésité³⁶². Enfin, comme décrit précédemment, l'administration de pectine (4 ou 8%) à un régime HFD contenant 30% de lard permettait d'atténuer la stéatose hépatique et ce fonction de la dose administrée³³¹. Cet effet bénéfique était également corrélé à une modulation du MI et des SCFAs avec augmentation des taux d'acétate et de propionate et diminution du valérate, de l'isovalérate et de l'isobutyrate. Le butyrate, quant à lui, n'était pas affecté par la supplémentation en fibres.

Certains de ces résultats ont été publiés au cours mon doctorat et souligne l'intérêt de l'utilisation des fibres. Ceci renforce la pertinence de mon objectif de thèse qui visait à prouver que les fibres, en l'occurrence la pectine, pouvait protéger le foie dans un modèle de NAFLD chez le rongeur et que cet effet protecteur était médié par le MI. La finalité de ce travail était bien évidemment de pouvoir proposer ce type d'approche dans la prise en charge des patients.

Dans notre étude, l'utilisation de faibles doses de pectine limite les effets délétères d'un régime gras, principalement en favorisant le brunissement du tissu adipeux, en modifiant structurellement le BAT et en atténuant la stéatose hépatique. L'étude du MI et le transfert du MI modifié par la pectine prouve que son effet bénéfique est étroitement liés à la composition de l'écosystème bactérien. Le MI possède plusieurs fonctions dont la production de métabolites qui interviennent dans la pathogenèse de nombreuses maladies métaboliques. Ici, nous avons fait l'hypothèse que les métabolites majeurs intervenant dans les effets de la pectine sur la NAFLD étaient les SCFAs. Il est cependant très probable que ce ne soient pas les seuls acteurs impliqués dans l'amélioration des lésions induites par le régime HFD. En effet, d'autres molécules comme les indoles, qui sont des métabolites du tryptophane, ont montré leur rôle potentiel dans la NAFLD ^{363, 364}. De même, les acides biliaires semblent intervenir et leur rôle pourrait être lié, au moins en partie, aux capacités chélatrices de la pectine, qu'on ne retrouve pas pour toutes les fibres et notamment pas pour l'inuline. Ainsi, en fonction du régime alimentaire des patients, les effets de la pectine pourraient être variables, cette dernière jouant son rôle chélateur s'il y a consommation d'un régime riche en cholestérol.

Outre les modifications des métabolites, les modifications du MI impactent également la nature des PAMPs et du LPS portés par ces bactéries. Ainsi, l'administration préventive de pectine qui induit une diminution des Proteobacteria et notamment des Desulfovibrionaceae pourrait induire une diminution du LPS. Cette hypothèse serait en accord avec les données de l'équipe de Nagata³⁶⁵ qui montre qu'une supplémentation en glucoraphanine, un composé issus des crucifères, entraîne une amélioration de la sensibilité à l'insuline, de la tolérance au glucose et une diminution de la stéatose hépatique chez des souris HFD. Ces effets s'accompagnent d'une diminution des concentrations plasmatiques en LPS, d'une diminution des marqueurs de l'inflammation dans le TA et le foie et d'un brunissement du tissu adipeux attesté par l'augmentation de l'expression d'UCP1 dans le TA. Cela renforcerait l'effet des

SCFAs sur les tissus adipeux, puisqu'un des mécanismes liant le MI aux modulations du BAT et du TA implique le LPS. Il a également été montré que l'activation du TLR4 par le LPS inhibait le brunissement du TA et induisait l'augmentation de la production de ROS et un dysfonctionnement mitochondrial. En revanche, une délétion en TLR4 permettait de protéger la fonction de la mitochondrie et favorisait la thermogénèse³⁶⁶. Une activation du récepteur TLR4 pourrait ainsi empêcher le brunissement du TA par l'intermédiaire d'une altération des fonctions mitochondriales. Une diminution des Desulfovibrionaceae a par ailleurs été associée à une amélioration de la prise de poids, à une diminution de la masse grasse et des TG hépatiques et à une amélioration de la tolérance au glucose lors d'une supplémentation en resvératrol chez des rongeurs sous régime HFD³⁶⁷⁻³⁶⁹.

Parmi les modulations du MI induites par l'administration préventive de pectine 2%, on observe une augmentation des Bacteroidetes, des Bacteroidaceae et une diminution des Peptostreptococcaceae ce qui correspond aux changements objectivés par l'étude de Zietak et al. Ces modifications de MI pourraient donc contribuer à l'activation du BAT et de la thermogénèse et aux bénéfices induits par modifications du métabolisme des ABs.

Le transfert du MI modifié par la pectine induit aussi une diminution des Epsilonbactareota et en particulier d'*Helicobacter* dont la présence est associée au risque de développement de la NAFLD³⁷⁰. L'implication du genre *Helicobacter* dans la pathogénèse de la NAFLD est suspectée d'être en lien avec l'insulinorésistance, et d'impacter la sécrétion d'adipokines.³⁷⁰ Une infection par *Helicobacter* est par ailleurs capable de moduler la composition du MI et suspectée d'agir sur la sécrétion de métabolites bactériens dont les SCFAs inhibant ainsi l'action de l'AMPK hépatique³⁷⁰. Cela favoriserait alors l'accumulation de lipides dans le foie et entraînerait une altération de la β -oxydation mitochondriale. Enfin la présence d'*Helicobacter* a été associée à une dégradation de la perméabilité de la barrière intestinale avec augmentation de la translocation de produits bactériens dont le LPS qui est un des mécanismes impliqués dans la NAFLD³⁷⁰. Il est donc probable qu'une partie des effets bénéfiques de la pectine soit liée à une réduction de l'endotoxémie et donc de l'inflammation systémique. Néanmoins, le dosage de LPS reste délicat dans nos modèles de rongeurs compte tenu des faibles quantités de plasma récupérables. De plus, ce plasma doit être manipulé dans des conditions exemptes de LPS contaminant ce qui aboutit à des résultats souvent peu convaincants.

L'ensemble des résultats obtenus sur les modèles murins démontre l'intérêt des fibres alimentaires dans la protection des atteintes métaboliques liées un régime gras et permet d'espérer des études thérapeutiques chez l'homme. Des limites apparaissent tout de même. De faibles doses de pectine ne permettent pas de traiter ou de prévenir complètement la pathologie. Si l'utilisation de hautes doses de pectine semble être efficace, la translation chez l'homme est difficilement envisageable en l'état. En effet une supplémentation de pectine à 15% dans le modèle murin correspondrait à l'administration de 70g de pectine quotidienne chez l'homme bien au-dessus des recommandations (30g/jour).

Cependant, la vigilance s'impose car il a été montré qu'une consommation à long terme de hautes doses de fibres était associée à des effets délétères pour la santé humaine. En effet, Singh et al. montrent, dans des modèles murins, qu'une consommation prolongée d'aliments enrichis en fibres (pectine et inuline) par des procédés industriels et donc considérées comme « raffinées » pour pallier les carences induites des régimes alimentaires occidentaux peut favoriser l'inflammation gastro-intestinale et le développement de carcinomes hépatocellulaires^{371, 372}. Dans leur étude, le régime HFD était enrichi en pectine, en inuline ou en FOS à hauteur de 7,5% et administré à des souris dysbiotiques (TLR5-/- ; TLR4-/- ; Lcn2-/- ; Nlrc4-/-) ou wild-type considérées comme non dysbiotiques (C57BL6). Au terme du protocole, les effets bénéfiques des fibres sur l'amélioration métabolique étaient observés mais les souris traitées développaient des carcinomes hépatocellulaires^{359, 372}. Les effets délétères étaient notamment corrélés à une élévation persistante des SCFAs dans le côlon qui s'avère plus dangereuse que protectrice. Une autre étude a montré que chez des rongeurs présentant une dysbiose, une supplémentation du régime par des fibres raffinées à haute dose entraînait le développement d'un hépatocarcinome cellulaire (HCC) tandis qu'une supplémentation « normale » en fibres alimentaires « naturelles » était au contraire bénéfique³⁵⁹. D'autres études montrent que les modulations du MI induites par les fibres généralement considérées comme bénéfiques peuvent, si elles sont trop importantes, induire une dysbiose. Ainsi, une surexpression de *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* induites par la fermentation de fibres favorise la génération d'ABs secondaires comme le deoxycholate et le lithocholate tous deux cytotoxiques et impliqués dans la carcinogénèse^{373, 374}. Ces études suggèrent donc que la manipulation et l'enrichissement des régimes alimentaires par de hautes doses de fibres

peuvent, en fonction du contexte environnemental et de la nature de la fibre, se révéler délétères pour l'hôte.

De même, plusieurs études, dont celle de Meslier et al., montrent la faiblesse des extrapolations mécanistiques faites à partir de l'étude de la composition du MI et les dosages des métabolites dans les fèces³⁷⁵. Ainsi, malgré une expression accrue de bactéries productrices de butyrate dans le MI des patients soumis à un régime méditerranéen, aucune modification dans la composition en SCFAs n'était retrouvée après dosage des métabolites bactériens dans les fèces^{375, 376}. Nous retrouvons les mêmes d'incohérences dans nos expérimentations. Des analyses complémentaires restent primordiales pour asseoir le rôle certain de ces métabolites dans les améliorations observées par une supplémentation en fibres.

Enfin, une des limites réside dans la complexité d'associer une espèce bactérienne spécifique à un effet, qu'il soit bénéfique ou délétère. Comme toutes les études menées sur le lien entre la modulation d'un régime et l'impact sur le MI, nos résultats montrent des changements de compositions à tous les niveaux taxonomiques. Cependant, des bactéries soupçonnées d'être dans nos travaux soit vectrices d'effets protecteurs des fibres, soit au contraire délétères sont retrouvées associées à des effets inverses dans d'autres publications. Il semble plus probable que la majeure partie des bactéries du MI puissent endosser un rôle dual, tantôt protecteur, tantôt délétère, dépendant de l'interaction avec d'autres facteurs, comme la nature du régime, la nature des fibres et les autres partenaires de l'écosystème bactérien. Cela est illustré par l'exemple de *Prevotella copri* dont la présence est tantôt associée à un phénotype sain, tantôt considérée comme associée à des désordres métaboliques³⁷⁶.

Malgré le rôle bénéfique que semble induire une supplémentation en fibres à un régime riche en graisse, de nombreuses interrogations mécanistiques persistent. Si une supplémentation modérée en fibres chez des patients ayant une consommation faible reste envisageable, une supplémentation en pectine à haute dose n'est pas concevable à terme chez l'homme mais sert ici de preuve de concept chez le rongeur. Les doses faibles de pectine et l'utilisation des FMT permettent de confirmer le lien fort existant entre le foie, les tissus adipeux, l'intestin et le MI.

L'écosystème bactérien reste un milieu dynamique majeur où la modulation d'un composé influe sur l'ensemble du système induisant soit un bénéfice pour l'hôte, soit un effet délétère. Il est ainsi fondamental de mieux caractériser les liens entre les différents acteurs de cet écosystème à savoir les espèces bactériennes et les métabolites qu'elles produisent. Le potentiel thérapeutique du MI et des métabolites bactériens est certain et une meilleure compréhension des phénomènes mécanistiques permet d'envisager leur utilisation future en tant que traitement en complément d'une alimentation enrichie naturellement en fibres dans des proportions adéquates.

ANNEXES

I. Microbiote intestinal et stéatohépatite non-alcoolique : Revue de littérature

Titre/auteurs/coordonnees/Title/authors/address

Microbiote intestinal et stéatopathie métabolique
Intestinal microbiota and non alcoholic fatty liver disease

Anne-Marie Cassard^{1,2}, Camille Houron, ^{1,2,4} Dragos Ciocan^{1,2,3}

¹INSERM UMRS U996 - Inflammation, Cytokines and Immunopathology, DHU
Hepatinov, Labex LERMIT 32 rue des carnets, 92140 Clamart, France

²Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92140, Clamart, France

³AP-HP, Service d'Hépatogastroentérologie et Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, 157
rue de la porte de Trivaux, 92140, Clamart, France.

⁴ Institut De Recherche Servier (IDRS), 11 rue des moulineaux, 92150 Suresnes,
France.

Auteur correspondant : AM Cassard. Cassard.doulcier@u-psud.fr, +33 1 41 28 80 37

Microbiote intestinal et stéatopathie métabolique

Résumé

La stéatopathie métabolique ou NAFLD regroupe un spectre de lésions du foie qui vont apparaître chez des individus en surpoids ou obèses présentant un syndrome métabolique. Cependant, tous ces individus ne développent pas les stades sévères de NAFLD ce qui a mené à l'identification de cofacteurs aggravants ou inversement protecteurs dont le microbiote intestinal. Les études réalisées dans des modèles de rongeurs ont ainsi permis de mettre en évidence le rôle causal du microbiote intestinal dans cette pathologie. Les motifs bactériens, tels que les lipopolysaccharides ou de l'ADN bactérien, de même que les métabolites produits par les bactéries intestinales sont directement impliqués dans la médiation de leurs effets bien que loin d'être totalement identifiés. La modulation par des fibres, des prébiotiques ou des probiotiques permet de prévenir ou d'améliorer la NAFLD dans les modèles murins. La transposition de ces données à la thérapeutique humaine est encourageante mais reste plus limitée. En effet, il existe clairement une dysbiose (modification du microbiote intestinal dans son ensemble) associée aux différents stades de la NAFLD. Les premiers essais cliniques effectués chez les patients en vue d'améliorer la NAFLD ont donné des résultats positifs bien que l'analyse reste compliquée compte tenu des nombreux facteurs confondants, tels que la prise de metformine ou d'inhibiteurs de la pompe à protons. Un premier essai clinique utilisant un métabolite issu d'*Akkermansia muciniphila* permet toutefois de dire que de nouvelles pistes thérapeutiques vont émerger dans les années à venir basées soit sur la modulation du microbiote intestinal directement, soit sur la modulation des cibles de ce microbiote intestinal.

Mots clés : NAFLD, microbiote intestinal, NASH, dysbiose

Summary

Non alcoholic fatty liver disease or NAFLD is a disease with a large spectrum of liver injury that could appear in overweight or obese individuals with a metabolic syndrome.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

However, among overweight or obese, only a subset of individuals develops severe forms of NAFLD. Thus, the susceptibility of NAFLD is related to cofactors that could be protective or conversely noxious. Studies carried out in rodent models have demonstrated that the intestinal microbiota is a cofactor with a causal role in NAFLD. The bacterial patterns as well as the metabolites produced by intestinal bacteria are directly involved in the mediation of their effects, although the mechanisms are far from being fully identified. Changing intestinal microbiota by using fibers, prebiotics or probiotics can prevent or improve NAFLD in murine models. The translation of these data to human therapeutics is encouraging but remains limited. Indeed, there is clearly a dysbiosis associated with the different stages of NAFLD. The first clinical trials performed in patients to improve NAFLD showed beneficial effects although their analysis remains complicated given the many confounding factors, such as the use of metformin or proton inhibitors. A first clinical trial using a metabolite from *Akkermansia muciniphila*, suggests that new therapeutic approaches will emerge in the coming years based either on the modulation of the intestinal microbiota directly or on the modulation of intestinal microbiota targets.

Keywords : NAFLD, intestinal microbiota, NASH, dysbiosis

Microbiote intestinal et stéatopathie métabolique

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Parmi les maladies nutritionnelles du foie, la stéatopathie métabolique ou (NAFLD, non alcoholic fatty liver disease) est une pathologie caractérisée par l'accumulation hépatique de lipides associée à une insulino-résistance et inclut deux entités pathologiques : la stéatopathie métabolique et la NASH (non-alcoholic steatohepatitis) qui peut évoluer vers des formes graves telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Cependant, tous les individus en surpoids ou obèses ne développent pas de NAFLD et cette susceptibilité individuelle ne peut être expliquée que par la seule variabilité génétique de l'hôte. Il y a donc d'autres cofacteurs qui participent à la progression des lésions du foie.

Les premières données concernant le rôle plausible du microbiote intestinal (MI) dans la NAFLD et la NASH sont issues d'études rapportant que l'administration de prébiotiques et de fibres, modulant le MI, est associée à une amélioration du métabolisme lipidique (1, 2). Cependant, il a fallu attendre les années 2000 pour que le rôle joué par le MI soit envisagé, en particulier grâce à l'utilisation de modèles animaux axéniques.

Le microbiote intestinal, un acteur dans le développement de la NAFLD

La colonisation de souris axéniques avec le MI issu de souris conventionnelles provoque une augmentation de la masse grasseuse, une insulino-résistance et une stéatose hépatique lors d'un régime riche en graisses. Ces effets ont été associés à une augmentation de l'absorption et du transfert des glucides au niveau du foie avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (3,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4). Inversement, un traitement antibiotique visant à la destruction du MI permet de réduire l'inflammation hépatique de souris obèses (5). La présence d'un MI semble donc nécessaire au développement de ces atteintes hépatiques mais tous les microbiotes n'ont pas le même impact. En effet, des expériences de transferts de microbiotes, réalisées chez la souris confirment le rôle causal de celui-ci dans la NASH. Ainsi, le transfert de MI de souris développant ou non un syndrome métabolique, quantifié par la sensibilité au glucose et une stéatose hépatique suite à un régime riche en graisses, (souris sensibles) à des souris axéniques induit le phénotype de la souris donneuse après un régime similaire. Au niveau du MI, les souris sensibles présentaient une augmentation de l'abondance des Firmicutes (au niveau du phylum), des *Barnesiella* et des *Roseburia* (au niveau du genre), de *Lachnospiraceae bacterium* et de *Barnesiella intestinihominis* (au niveau des espèces) et les souris résistantes une augmentation d'*Allobaculum* (au niveau du genre) et de *Bacteroides vulgatus* (au niveau des espèces) (6). Dans un autre modèle, le transfert de MI de rats conventionnels à des rats sous régime enrichi en graisses et fructose développant une NASH associée à une hypertension portale, est suffisant pour inverser les lésions de NASH et améliorer l'hypertension portale (7). De même, le transfert de MI d'un patient présentant une NASH chez des souris axéniques aggrave les lésions induites par un régime enrichi en graisses. Chez ces souris, était retrouvée une augmentation de l'abondance des Firmicutes comme décrit dans l'étude précédente (6) (dont les Streptococcaceae) et des Proteobacteria (dont les Enterobacteriaceae) par rapport aux souris transplantées avec le MI de patients contrôles ne présentant pas de NASH ni de maladie déclarée (8).

Ces résultats prouvent que le MI est un cofacteur clé dans la NAFLD induite chez le rongeur et suggèrent qu'une modification du MI pourrait être une nouvelle voie

thérapeutique pour traiter ou prévenir ces pathologies d'où l'importance de valider ces données chez l'homme.

Le microbiote intestinal au cours de la NAFLD chez l'homme

Chez l'homme, plusieurs études ont analysé le MI de patients présentant une NAFLD (Tableau 1). La majorité de ces études se basent sur le séquençage 16S de l'ARN ribosomique.

Les premières études réalisées chez l'homme trouvaient une diminution des Firmicutes chez des patients ayant une NASH dont une baisse des *Faecalibacterium* (9). On notait également une diminution entre autres des *Oscillibacter* et une augmentation des *Lactobacillus* chez des patients ayant une NAFLD dans deux études indépendantes (10, 11). Une étude ultérieure, réalisée par analyse PCR et donc plus ciblée montrait que le phylum des Bacteroidetes est diminué chez les personnes qui ont une NASH par rapport aux patients qui ont une simple stéatose (12). Plus récemment il a été montré qu'au sein de ce phylum, on trouve une augmentation des *Bacteroides* et une diminution des *Prevotella* chez les patients ayant une NAFLD histologiquement prouvée. De plus, l'abondance des *Bacteroides* a été associée de manière indépendante à la présence d'une NASH, diagnostiquée chez 10 des patients de cette étude (13). Les patients ayant une fibrose F2 présentaient en plus une augmentation de l'abondance relative des Ruminococcus. En analyse multivariée, l'abondance des Ruminococcus a été associée de manière indépendante à la présence d'une fibrose avancée. La prédiction des fonctions métaboliques du MI a montré une augmentation du métabolisme des glucides chez les patients ayant une NASH et les patients avec une fibrose avancée. En revanche, on observe une augmentation du métabolisme des lipides et des acides aminés uniquement chez les

1 patients ayant une NASH (13). Dans une autre étude sur 86 patients avec une NAFLD
2 histologiquement prouvée et pour laquelle un séquençage métagénomique a été
3 réalisé, les patients ayant une NAFLD modérée présentaient des taux plus élevés de
4 Firmicutes, également retrouvés dans une étude plus récente (14), d'*Eubacterium*
5 *rectale*, de *Ruminococcus obeum*, et de *Faecalibacterium prausnitzii* alors que les
6 patients avec une fibrose avancée présentaient des taux plus élevés de Proteobacteria
7 (phylum), de *Bacteroides vulgatus* et d'*Escherichia coli*. L'analyse des voies
8 métaboliques de ces bactéries a montré une augmentation des voies liées au
9 métabolisme des glucides chez les patients avec une fibrose avancée et une
10 augmentation des enzymes impliquées dans le métabolisme de certains acides gras
11 à chaîne courte (AGCC) : butyrate, D-lactate et propionate. Les patients avec une
12 NAFLD modérée avaient plus d'enzymes impliquées dans le métabolisme du lactate,
13 de l'acétate et du formate.

14 Plus récemment, une étude prospective a comparé la composition du MI chez
15 86 personnes ayant une NAFLD : 72 avaient une fibrose légère ou modérée (fibrose 0
16 à 2) et 14 avaient une fibrose avancée (stade 3 à 4). A partir de 37 espèces
17 bactériennes, de l'index de diversité de Shannon, de l'âge et de l'indice de masse
18 corporelle, une courbe ROC robuste avec un AUC à 0,936 permettait de discriminer
19 les groupes. On notait une augmentation de la représentation d'*Escherichia coli* chez
20 les personnes qui avaient une fibrose avancée (15). Or, *E. coli* est une bactérie plus
21 abondante en cas d'hypertension portale. Ces résultats suggèrent ainsi que la
22 dominance d'*E. coli* pourrait apparaître avant même le stade de cirrhose et
23 d'hypertension portale. Dans une étude menée sur 37 patients obèses ayant une
24 NAFLD, les patients avec une fibrose présentaient une augmentation des
25 Fusobacteria (dont la famille des Fusobacteriaceae) et des Bacteroidetes et une

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

diminution des Firmicutes (dont les familles des Ruminococcaceae et des Lachnospiraceae et les genres de Streptococcus et de Dorea) et d'Actinobacteria (dont la famille des Coriobacteriaceae) (16). Une augmentation des Streptococcus étaient également retrouvée dans une étude récente (14).

Des bactéries ou des fragments d'ADN codant pour le 16S ribosomal peuvent passer la barrière intestinale et atteindre la circulation systémique, on peut donc identifier 'un microbiote circulant'. Dans l'étude, ci-dessus, menée sur 37 patients obèses ayant une NAFLD, la présence d'une fibrose hépatique était corrélée à une concentration plus élevée de l'ADN bactérien 16S (16). La diversité bactérienne était diminuée chez les patients avec une fibrose avec des changements de composition : augmentation de l'abondance des Proteobacteria (phylum), de *Sphingomonas* et de *Bosea* (genre) et une diminution des Actinobacteria (phylum) et de *Variovorax* (genre) chez les patients avec une fibrose par rapport à ceux sans fibrose. Seuls des patients avec fibrose modérée étaient inclus dans l'étude. Il est à noter que les variations observées dans le microbiote circulant n'étaient pas corrélées à celles du MI. Néanmoins, cette publication suggère que l'utilisation de marqueurs sériques fondée sur l'analyse du microbiote pourrait être utile dans le diagnostic de la fibrose hépatique.

Une dysbiose a également été recherchée au cours de la NAFLD pédiatrique. Chez les enfants obèses ayant une NASH, le MI est différent de celui des enfants obèses n'ayant pas de NASH et d'individus témoins en bonne santé. En l'absence de toute consommation d'alcool, les enfants obèses ayant une NASH avaient une éthanolémie supérieure à celle observée chez les enfants obèses sans NASH ou celle des sujets témoins (17). Cela était associé à une augmentation des bactéries productrices d'alcool (Enterobacteriaceae, *Bacteroides* et *Clostridium*) chez les patients présentant une NASH. L'étude récente de patients ayant une NAFLD (cohorte

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

chinoise) a montré que 60% des patients avaient *Klebsiella pneumoniae* dans leur MI, bactérie capable de produire de l'alcool. Le transfert du MI de ces patients induisait une NASH dans des modèles murins. De même que l'addition de cette bactérie dans un MI provenant d'un individu sain. En revanche, l'éradication de cette bactérie avant la transplantation permettait de prévenir l'apparition de la NASH chez les souris (18). Ces données sont donc en faveur du rôle de faibles doses d'alcool comme facteur favorisant l'apparition d'une NAFLD.

Dans une autre étude chez l'enfant, on observe une augmentation d'Actinobacteria (phylum), de *Bradyrhizobium*, d'*Anaerococcus*, de *Peptoniphilus*, de *Propionibacterium*, de *Dorea* et de *Ruminococcus* (genre) et une diminution des Bacteroidetes, d'*Oscillospira* et de *Rikenellaceae* (genre) par rapport à une population d'enfants « sains ». Les enfants ayant une NASH présentent une augmentation de *Ruminococcus*, de *Blautia* et de *Dorea* par rapport aux enfants « sains » utilisés en contrôle. L'analyse multivariée a montré que l'association des taxa bactériens d'*Oscillospira*, de *Rickenellaceae*, de *Parabacteroides*, de *Bacteroides fragilis*, de *Sutterella* et de *Lachnospiraceae*, et de métabolites, 4-méthyl-2-pentanone, 1-butanol, et 2-butanone pouvaient discriminer les enfants ayant une NAFLD des individus contrôles (AUROC 0,997). L'association des taxa bactériens et des métabolites n'a cependant pas permis de discriminer les patients selon le degré de sévérité de la NAFLD (19).

Microbiote intestinal et NAFLD avancée : cas de la cirrhose chez l'homme

Les patients avec une cirrhose présentent une augmentation de la perméabilité intestinale et une augmentation de la translocation bactérienne. Plusieurs études se sont intéressées aux changements de MI chez les patients ayant une cirrhose mais

1 bien souvent les études regroupent les cirrhoses, toutes causes étiologiques
2 confondues, en particulier d'origines virales ou liées à une consommation excessive
3 d'alcool (20). Néanmoins, les données ont permis aux auteurs de suggérer un index
4 appelé « cirrhosis dysbiosis ratio » (CDR). Le CDR tient compte de la balance
5 observée et propose un ratio entre bactéries bénéfiques (autochtones –
6 Lachnospiraceae, Ruminococcaceae et Clostridiales Incertae Sedis XIV) et bactéries
7 potentiellement pathogènes (pathobiontes – Enterococcaeae, Staphylococcaeae et
8 Enterobacteriaceae). Les patients avec une cirrhose décompensée ou ayant une
9 infection ont un CDR diminué, ce qui signifie une augmentation des bactéries
10 potentiellement pathogènes. D'autre part, un CDR bas a été associé à une mortalité
11 et des insuffisances d'organes à 30 jours (21). Plus récemment, l'analyse du MI de
12 patients ayant une NAFLD avec ou sans cirrhose a également montré une
13 augmentation des Enterobacteriaceae et une diminution des Peptostreptococcaeae.
14 Plus globalement, ils ont assigné une signature microbienne associée à la cirrhose
15 induite au cours de la NAFLD (22). Une analyse métagénomique du MI de patients
16 cirrhotiques a confirmé la présence d'une dysbiose avec une diminution des
17 Bacteroidetes et une augmentation des Proteobacteria et des Fusobacteria. De plus,
18 54 % des bactéries responsables de cette dysbiose sont d'origine buccale, ce qui
19 suggère un rôle de ce microbiote buccal dans la cirrhose (23). Cette hypothèse a été
20 confirmée par une étude qui a démontré que les patients ayant une cirrhose présentent
21 une dysbiose salivaire. Cette dysbiose montre, entre autres, une augmentation de
22 pathobiontes, Enterobacteriaceae et Enterococcaeae, et est associée à une
23 augmentation des marqueurs inflammatoires au niveau buccal. Les changements
24 dans le microbiote salivaire étaient similaires à ceux observés au niveau intestinal
25 (augmentation d'Enterobacteriaceae et d'Enterococcaeae). Les patients avec une

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

dysbiose salivaire avaient également un taux plus élevé de ré-hospitalisation à 90 jours (24). Récemment, une intervention permettant l'amélioration de la santé buccale chez les patients cirrhotiques, en particulier ceux avec une encéphalopathie hépatique, a été associée à une amélioration de la dysbiose buccale, de l'inflammation systémique, du score de MELD et des fonctions cognitives (25).

Les patients avec un épisode de décompensation ont une diversité et une richesse bactérienne diminuée par rapport aux témoins sains. Au niveau de la composition, on observe une diminution des taxa considérés comme bénéfiques (les Bacteroidaceae, les Ruminococcaceae et les Lachnospiraceae) et une augmentation des pathobiontes (les Pasteurellaceae, les Streptococcaceae et les Enterococcaceae). De plus, l'abondance des Pasteurellaceae a été identifiée a comme un facteur de risque indépendant de la mortalité (26).

La cirrhose s'accompagne de complications et pour certaines, il a été démontré qu'elles étaient associées à une dysbiose particulière. Parmi les complications de la cirrhose, le lien entre dysbiose et encéphalopathie hépatique (EH) a été particulièrement étudié. La dysbiose chez les cirrhotiques, analysée par métagénomique, a démontré que les gènes bactériens impliqués dans la production d'ammoniaque et de GABA étaient surreprésentés (23). Des études chez des patients cirrhotiques avec une EH ont montré l'existence d'une dysbiose avec une augmentation des Staphylococcaceae, d'Enterococcaceae, des Porphyromonadaceae et des Lactobacillaceae par rapport aux patients ayant une cirrhose sans EH ou des témoins sains. Ces modifications sont associées à un profil génétique différent de ces bactéries avec une augmentation des fonctions impliquées dans la synthèse d'endotoxines et d'ammoniaque (27). La dysbiose observée pourrait

1
2 avoir un impact sur d'autres métabolites bactériens, comme les métabolites du
3 tryptophane qui ont également été corrélés à l'EH dans plusieurs études (28, 29).

4
5 Les ascites sont également une complication fréquente de la cirrhose. Les
6 patients avec ascite ont eux-aussi un microbiome spécifique au niveau circulant et
7 intestinal. Cependant, seulement trois taxa communs ont été retrouvés entre l'ascite
8 et le MI suggérant soit une origine extra-intestinale soit une abondance faible au niveau
9 intestinal des bactéries détectées dans l'ascite (30).

10
11
12 Les traitements et la diète modulent le microbiote, ce qui a un impact sur les
13 complications chez les patients cirrhotiques (31). La prise d'inhibiteurs de la pompe à
14 protons (IPP) modifie le microbiote avec une augmentation des Enterococci chez les
15 patients (32). De plus, dans des modèles animaux de NAFLD, la suppression de la
16 sécrétion gastrique acide par les IPP induit une augmentation des Enterococci et
17 augmente leur translocation au niveau hépatique où ils activent les cellules de Kupffer
18 (via le récepteur TLR2) et la production d'IL-1 β et augmentent ainsi l'inflammation (32).

19
20
21 Chaque complication de la cirrhose est donc associée à une dysbiose
22 particulière qui à ce stade pourrait permettre d'anticiper les complications observées
23 en fonction des individus.

24 25 26 **Mécanismes moléculaires**

27
28 Dans la NAFLD, la barrière intestinale physique est altérée dans les modèles
29 animaux, avec une augmentation de la translocation des produits bactériens vers le
30 foie (33). Cependant ce résultat n'est pas confirmé par toutes les études (34) et en
31 particulier chez l'homme puisque seulement une partie des patients avec une NAFLD
32 a une augmentation de la perméabilité intestinale (35). Ces discordances pourraient
33 être dues aux différentes techniques utilisées (taux d'endotoxine circulante, calcul du

1 ratio lactulose/mannitol ou lactulose/rhamnose) (35, 36). Néanmoins, le rôle des motifs
2 bactériens a été bien étudié, entre autres, par leur action sur les récepteurs de type
3 TLRs. L'activation des récepteurs au TLR induit une insulino-résistance, une
4 inflammation et une stéatose hépatique, phénomène appelé « endotoxémie circulante
5 ». Ces effets sont prévenus chez les souris déficientes pour le complexe CD14/TLR4,
6 ligand majeur du LPS (37). De même, un déficit de MyD88 hépatique, (une molécule
7 clé dans la signalisation du TLR4), induit une altération du métabolisme lipidique et
8 glucidique qui aggrave les éléments du syndrome métabolique et la stéatose
9 hépatique (38).

10 L'activation des TLRs induit la cascade de signalisation de l'inflammasome,
11 ensemble de complexes protéiques cytoplasmiques qui coordonne la réponse anti-
12 inflammatoire. Tout comme la déficience en TLR5, la déficience de certaines protéines
13 de l'inflammasome induit une augmentation de l'inflammation hépatique chez des
14 souris sous régime enrichi en graisses. Ceci est associé à une augmentation de
15 l'endotoxémie portale et à une augmentation de la perméabilité intestinale (39, 40).
16 Chez ces souris déficientes on retrouve, entre autres, une augmentation des taux de
17 Porphyromonadaceae, de Prevotellaceae et d'Erysipelotrichaceae (39).

18 Dans ces modèles murins de NAFLD, la perméabilité intestinale est altérée.
19 L'activation des TLR dans les cellules intestinales et dans les cellules de Paneth, de
20 même que la production d'IL22, induisent l'expression des peptides anti-bactériens,
21 en particulier les RegIIIg et RegIIIb (41, 42). Néanmoins, la déficience en RegIIIb ou
22 RegIIIg ne suffit pas pour aggraver significativement la NASH dans un modèle animal
23 d'obésité (34). De plus, les souris transgéniques surexprimant RegIIIg ne sont pas
24 protégées de l'obésité ni de la NASH contrairement à ce qui est observé dans une
25 autre maladie nutritionnelle hépatique, la maladie alcoolique du foie (34).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Malgré ces données chez l'animal, l'impact de ces voies qui pourtant dépendent de la composition bactérienne reste à confirmer chez l'homme. En effet, un essai récent de phase 2 ciblant l'inhibition du TLR4 par un antagoniste n'a pas permis l'amélioration de la stéatose ou de la fibrose chez des patients avec une NASH (43). Bloquer la voie TLR4 n'est donc pas suffisante pour améliorer la physiopathologie de la NAFLD.

Mécanismes moléculaires : les métabolites bactériens

Le MI a une activité métabolique importante, reflet de sa diversité génétique, qui se traduit par la synthèse de nombreux métabolites (44). Ces métabolites vont interagir avec les différents organes de l'hôte, entre autres, via la circulation sanguine. Parmi ces métabolites, on trouve les composés volatiles, l'alcool, la choline, les acides aminés branchés, les acides gras à chaîne courte (AGCC), les indoles, dérivés du tryptophane, et les acides biliaires dont le rôle de certains est établi dans la NAFLD

La choline : La déficience en choline est un modèle de NAFLD bien établi chez le rongeur dans lequel on peut moduler le MI et la survenue de la fibrose sans moduler la NASH (45). Dans le foie la choline va participer à la biogenèse de la phosphatidylcholine, au maintien des stocks de S-adénosyl méthionine et est également essentielle dans la production des VLDL et des transports de lipides. De fait les niveaux de phosphatidylcholine sont abaissés au cours de la NAFLD, mais sans qu'un rôle direct de la choline n'ait à ce jour été établi chez l'homme (46).

Les AGCC : Les AGCC sont issus principalement de la fermentation dans le côlon des fibres et non-digérées par l'hôte. Ils ont de nombreux rôles métaboliques au niveau de l'hôte. L'acétate, le propionate et le butyrate représentent 95% de l'ensemble des AGCC dans le côlon (47). Au niveau intestinal, les AGCC, en particulier, le

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

butyrate, sont la source d'énergie principale des colonocytes. Les AGCC vont agir au niveau cellulaire via des récepteurs couplés aux protéines G pour lesquels l'affinité de chaque AGCC est spécifique (48). La diversité de leurs effets va donc dépendre d'une part des récepteurs exprimés par les cellules et d'autre part des concentrations relatives des différents AGCC qui arrivent à un tissu.

Il a été démontré que certains AGCC ont un effet protecteur vis à vis de la NAFLD. Le butyrate est capable d'activer la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) qui va d'une part limiter l'inflammation mais également le stress oxydant et le métabolisme des lipides et du glucose (49). Les AGCC ont un effet au niveau épigénétique avec en particulier le butyrate qui inhibe les histones déacétylases (HDAC) et permet ainsi la transcription de divers gènes qui protègent de la NAFLD (50). Inversement, le propionate stimule la gluconéogenèse et l'acétate et le butyrate stimulent la lipogenèse au niveau hépatique favorisant l'apparition de la NAFLD (47). Néanmoins, chez la souris une supplémentation en AGCC ou de leurs précurseurs dans l'alimentation a montré un effet protecteur contre l'obésité, l'insulino-résistance, et la stéatose hépatique (51).

Chez l'homme, des dosages d'AGCC ont été réalisés, la disparité des AGCC effectués et des résultats ont pour l'instant freiné leur usages chez l'homme.

L'analyse du profil métabolique de patients ayant une NAFLD ou une NASH a montré des changements des taux de succinate dans divers compartiments de l'organisme. Le succinate est notamment produit par des bactéries dont les *Bacteroidaceae* et les *Prevotella* retrouvées augmentées dans les fèces des patients avec une NASH (13, 17). Des patients avec une fibrose avancée présentent des taux plus élevés d'acide formique et d'acétate dans les fèces. Les patients atteints d'une NAFLD ont quant à eux des taux élevés de butyrate et de propionate (15). Cependant

1
2 les enfants avec une NAFLD ont des taux plus faibles d'acide formique, d'acétate et
3 de valérate (52).

4
5 **Les indoles, dérivés du tryptophane :** Le tryptophane est un acide aminé
6 aromatique essentiel qui peut suivre trois voies métaboliques : la voie de la sérotonine
7 dans les cellules entéro-endocrines et la voie de la kynurénine dans les cellules
8 épithéliales et immunitaires, toutes deux assurées par l'hôte et une voie exclusivement
9 bactérienne, la voie des indoles. Ces indoles vont être des ligands du récepteur aux
10 hydrocarbures aromatiques (AhR) (53). Le récepteur AhR est exprimé dans de
11 nombreux types cellulaires. Au niveau des hépatocytes, il participe à l'élimination des
12 xénobiotiques par activation des cytochromes P450 (54). Au niveau du tube digestif,
13 son rôle dans les cellules de l'immunité est essentiel pour moduler la production de
14 mucus et des peptides anti-bactériens et ainsi maintenir l'intégrité de la barrière
15 intestinale (55).

16
17 Un déficit en agonistes d'AhR est associé à un syndrome métabolique et la
18 correction de ce déficit, soit par l'administration d'un agoniste AhR, soit par
19 l'administration de *Lactobacille*, améliore les éléments du syndrome métabolique et la
20 stéatose hépatique. Ces effets sont liés à une amélioration de la barrière intestinale et
21 à une augmentation de la sécrétion de l'entéro-hormone GLP-1 (56). De plus, l'indole-
22 3-acetate, un métabolite du tryptophane, diminue l'inflammation liée aux lipides et la
23 lipogenèse dans les hépatocytes (57). Une diminution du tryptophane par une
24 augmentation de son métabolisme par la voie de la kynurénine est associée à la
25 survenue d'obésité et d'un syndrome métabolique. Après inhibition ou suppression de
26 l'indoleamine 2,3-dioxygénase, l'enzyme qui transforme le tryptophane en kynurénine,
27 le taux intestinal des ligands d'AhR produits par le MI augmente et une amélioration
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

du syndrome métabolique et de la stéatose hépatique est observée (58). Ces effets suggèrent un rôle du MI via le métabolisme du tryptophane dans la NASH.

Les acides biliaires : Les acides biliaires primaires synthétisés et conjugués par le foie sont ensuite déconjugués et transformés par le MI. Le profil des acides biliaires est donc étroitement lié aux enzymes exprimées par le MI (59). L'homéostasie des acides biliaires est perturbée dans les modèles animaux et chez les patients avec une NAFLD et une NASH (60-62). Les acides biliaires à travers leurs récepteurs et notamment le FXR sont impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique (augmentation de la sensibilité à l'insuline, inhibition de la gluconéogenèse et augmentation de la glycogénèse (63, 64). On retrouve une augmentation de l'acide chénodéoxycholique (CDCA), de l'acide déoxycholique (DCA), de l'acide ursodéoxycholique et du ratio DCA/CDCA dans le plasma (61) et de l'acide cholique dans les hépatocytes (60). Cela est corrélé à la sévérité de l'inflammation portale et lobulaire, et de la stéatose. De même, on observe une augmentation de l'acide tauro-lithocholique, de l'acide glycocholique et de l'acide taurocholique (65). L'activation du FXR intestinal par les acides biliaires induit la sécrétion du facteur de croissance fibroblastique (FGF19) qui inhibe la synthèse des acides biliaires au niveau hépatique. Chez les patients ayant une NAFLD, le FGF19 est diminué signe d'un profil d'acides biliaires ayant une capacité agoniste faible et donc favorisant une aggravation de la NAFLD (66). Chez des patients ayant une NAFLD, l'acide obéticholique, un agoniste FXR, diminue le score histologique de la NASH (67). Un analogue du FGF19 (NGM282) induit quant à lui une diminution du contenu en lipides hépatiques chez des patients ayant une NASH (68).

Modulation du microbiote intestinal dans la NAFLD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Le MI semble donc une cible thérapeutique intéressante pour moduler l'apparition et l'évolution de la NAFLD. Dans cette optique, il existe plusieurs stratégies pour modifier le MI : la transplantation fécale qui pose le problème du donneur, les fibres ou prébiotiques, les probiotiques ou bien cibler les voies métabolites impactées par le MI. De nombreuses études ont été faites chez les rongeurs, mais le fait que les pré- ou probiotiques soient donnés de façon préventive entraîne un biais important. Néanmoins, ces études ont permis de mettre en évidence l'impact de composés végétaux, de certaines fibres et de probiotiques sur la composition du MI et l'apparition des lésions hépatiques au cours de la NAFLD dont certaines ont été testées chez l'homme (69, 70).

L'usage de probiotiques, principalement des bactéries lactiques démontre que leur consommation peut améliorer les marqueurs hépatiques testés ALAT, GGT, stéatose hépatique et parfois la fibrose chez des patients atteints de NAFLD (71-76) ou d'un syndrome métabolique (77-79) (Tableaux 2 et 3). Néanmoins ces effets ne sont pas toujours observés (80-83). Les études réalisées chez l'homme se compliquent par la diversité de l'alimentation quotidienne et la présence possible dans certains composés végétaux de molécules ayant une action sur le MI.

Récemment, un essai clinique a été réalisé chez des individus volontaires obèses ou en surpoids utilisant *Akkermansia muciniphila* (84). Cette bactérie appartenant au phylum des Verrucomicrobia a d'abord été identifiée pour ses effets bénéfiques dans le syndrome métabolique (85, 86). Néanmoins, elle améliore également les lésions hépatiques dans un modèle de maladie alcoolique du foie chez la souris (87). Son utilisation chez l'homme n'ayant jamais fait ses preuves, des patients ont été supplémentés quotidiennement par *A. muciniphila* vivante ou pasteurisée pendant 3 mois. L'essai clinique a démontré une bonne tolérance à cette

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

bactérie et une amélioration des ASAT et de la GGT dans le groupe traité avec la bactérie pasteurisée.

Certaines études ont également évalué l'impact de symbiotiques où les prébiotiques utilisés étaient principalement le FOS (fructo-oligo-saccharide) mais également l'inuline en association avec des bactéries lactiques. Dans ces études on note également une variabilité dans les effets sur les constantes hépatiques (Tableau 4). L'association avec du FOS a majoritairement été associée à une amélioration des ALT, de la GGT et/ou de la stéatose (88-94) plus qu'à une absence d'effet (95, 96), voire une augmentation des ALAT (97).

Conclusion

En conclusion, le MI joue un rôle important dans la physiopathologie de la NAFLD en particulier via les métabolites bactériens produits. Cependant, la diversité des métabolites produits et les interactions croisées justifient d'approfondir la compréhension des voies moléculaires impliquées. Par ailleurs, les techniques d'analyse s'améliorant, le mycobiote, également source de motifs fongiques et de métabolites doit rentrer dans nos approches d'analyse comme un cofacteur potentiel de dysbiose. Néanmoins, on peut imaginer dans les années à venir améliorer la prise en charge des patients ayant une NAFLD en ciblant le MI ou les voies métaboliques dans lesquelles il est impliqué.

Conflits d'intérêts :

A-M. C. a reçu des fonds de voyage pour des congrès et pour une conférence de Biocodex et des royalties de Elsevier-Masson, Solar, Flammarion/Versilio et John

1 Libbey Eurotext. **D.C.** a reçu des bourses de voyage de Biocodex et Gilead, des
2 remboursements de frais de congrès par Gilead et des royalties de John Libbey
3 Eurotext. Les tableaux 1 et 2 ont été tirés de la thèse de D.C. et actualisés.
4
5
6
7 **C.H.** a reçu une bourse CIFRE par l'Institut de recherche Servier.
8
9

10 **Abbreviations :**

11 AhR : Aryl hydrocarbon receptor

12 ARNr : ARN ribosomal

13 AGCC : Acides gras à chaîne courte

14 ALAT : Alanine aminotransférase

15 AMPK : AMP-activated protein kinase

16 ASAT : Aspartate aminotransférase

17 AUROC : Area Under the Receiver Operating Characteristic curve

18 CDCA : Acide chénodéoxycholique

19 CDR : Cirrhosis dysbiosis ratio

20 DCA : Acide déoxycholique

21 EH : Encéphalopathie hépatique

22 FGF19 : Fibroblast growth factor 19

23 FXR : Farnesoid X receptor

24 FOS : Fructo-oligopolysaccharide

25 GABA : Acide γ -aminobutyrique

26 GGT : Gamma-glutamyl transférase

27 GLP-1 : Glucagon-like peptide-1

28 IPP : Inhibiteur de la pompe à protons

29 MI : Microbiote intestinal

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NASH : Non alcoholic steatohepatitis

NAFLD : Non alcoholic fatty liver disease

LPS : Lipopolysaccharides

RegIIIg,b : Regenerating islet-derived protein 3 gamma et beta

TLR : Toll like receptor

VLDL : Very low density lipoprotein

Références

1. Delzenne NM, Kok N. Effect of non-digestible fermentable carbohydrates on hepatic fatty acid metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1998;26(2):228-30.
2. Kok N, Roberfroid M, Delzenne N. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism.* 1996;45(12):1547-50.
3. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718-23.
4. Safari Z, Gerard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(8):1541-58.
5. Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, Durand-Gasselini I, et al. Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1459-69.
6. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut.* 2013;62(12):1787-94.
7. Garcia-Lezana T, Raurell I, Bravo M, Torres-Arauz M, Salcedo MT, Santiago A, et al. Restoration of a healthy intestinal microbiota normalizes portal hypertension in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2018;67(4):1485-98.
8. Chiu CC, Ching YH, Li YP, Liu JY, Huang YT, Huang YW, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Exacerbated in High-Fat Diet-Fed Gnotobiotic Mice by Colonization with the Gut Microbiota from Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients.* 2017;9(11).
9. Wong VW, Tse CH, Lam TT, Wong GL, Chim AM, Chu WC, et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PLoS One.* 2013;8(4):e62885.
10. Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2015;5:8096.
11. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(7):868-75 e1-3.
12. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013;58(1):120-7.
13. 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):764-75.

14. Nistal E, Saenz de Miera LE, Ballesteros Pomar M, Sanchez-Campos S, Garcia-Mediavilla MV, Alvarez-Cuenllas B, et al. An altered fecal microbiota profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with obesity. *Rev Esp Enferm Dig.* 2019;111(4):275-82.
15. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2017;25(5):1054-62 e5.
16. Lelouvier B, Servant F, Paise S, Brunet AC, Benyahya S, Serino M, et al. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology.* 2016;64(6):2015-27.
17. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013;57(2):601-9.
18. Yuan J, Chen C, Cui J, Lu J, Yan C, Wei X, et al. Fatty Liver Disease Caused by High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Metab.* 2019;30(4):675-88 e7.
19. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology.* 2017;65(2):451-64.
20. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Lei D, Wang Y, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology.* 2011;54(2):562-72.
21. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol.* 2014;60(5):940-7.
22. Caussy C, Tripathi A, Humphrey G, Bassirian S, Singh S, Faulkner C, et al. A gut microbiome signature for cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Commun.* 2019;10(1):1406.
23. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature.* 2014;513(7516):59-64.
24. Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Thacker LR, Daita K, Kang DJ, et al. Gut Microbiota Alterations can predict Hospitalizations in Cirrhosis Independent of Diabetes Mellitus. *Sci Rep.* 2015;5:18559.
25. Bajaj JS, Matin P, White MB, Fagan A, Deeb JG, Acharya C, et al. Periodontal therapy favorably modulates the oral-gut-hepatic axis in cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018;315(5):G824-G37.
26. Chen Y, Guo J, Qian G, Fang D, Shi D, Guo L, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(9):1429-37.
27. Ahluwalia V, Betrapally NS, Hylemon PB, White MB, Gillevet PM, Unser AB, et al. Impaired Gut-Liver-Brain Axis in Patients with Cirrhosis. *Sci Rep.* 2016;6:26800.
28. Montagnese S, Biancardi A, Schiff S, Carraro P, Carla V, Mannaioni G, et al. Different biochemical correlates for different neuropsychiatric abnormalities in patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(2):558-66.
29. Riggio O, Mannaioni G, Ridola L, Angeloni S, Merli M, Carla V, et al. Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients: a study on the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(6):1374-81.
30. Santiago A, Pozuelo M, Poca M, Gely C, Nieto JC, Torras X, et al. Alteration of the serum microbiome composition in cirrhotic patients with ascites. *Sci Rep.* 2016;6:25001.
31. Bajaj JS, Idilman R, Mabudian L, Hood M, Fagan A, Turan D, et al. Diet affects gut microbiota and modulates hospitalization risk differentially in an international cirrhosis cohort. *Hepatology.* 2018;68(1):234-47.
32. Llorente C, Jepsen P, Inamine T, Wang L, Bluemel S, Wang HJ, et al. Gastric acid suppression promotes alcoholic liver disease by inducing overgrowth of intestinal *Enterococcus*. *Nat Commun.* 2017;8(1):837.
33. Mao JW, Tang HY, Zhao T, Tan XY, Bi J, Wang BY, et al. Intestinal mucosal barrier dysfunction participates in the progress of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):3648-58.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
34. Bluemel S, Wang L, Martino C, Lee S, Wang Y, Williams B, et al. The Role of Intestinal C-type Regenerating Islet Derived-3 Lectins for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2018;2(4):393-406.
 35. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):222-32.
 36. Yuan J, Baker SS, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Xie J, et al. Endotoxemia unrequired in the pathogenesis of pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(6):1292-8.
 37. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
 38. Csak T, Pillai A, Ganz M, Lippai D, Petrasek J, Park JK, et al. Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. *Liver Int*. 2014;34(9):1402-13.
 39. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
 40. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-31.
 41. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015;21(7):698-708.
 42. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*. 2011;334(6053):255-8.
 43. Diehl AM, Harrison S, Caldwell S, Rinella M, Paredes A, Moylan C, et al. JKB-121 in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: A Phase 2 Double Blind Randomized Placebo Control Study. *J Hepatol*. 2018;68:S103.
 44. Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein PC, Mazmanian SK. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab*. 2014;20(5):719-30.
 45. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology*. 2009;49(3):989-97.
 46. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med*. 2019;11(2).
 47. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol*. 2016;7:185.
 48. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.
 49. Day EA, Ford RJ, Steinberg GR. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(8):545-60.
 50. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2019;68(2):359-70.
 51. Weitkunat K, Stuhlmann C, Postel A, Rumberger S, Fankhanel M, Woting A, et al. Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):6109.
 52. Michail S, Lin M, Frey MR, Fanter R, Paliy O, Hilbush B, et al. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015;91(2):1-9.
 53. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013;39(2):372-85.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
54. Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(7):1366-79.
55. Lamas B, Natividad JM, Sokol H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol.* 2018;11(4):1024-38.
56. Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, et al. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 2018.
57. Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, et al. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Rep.* 2018;23(4):1099-111.
58. Laurans L, Venteclef N, Haddad Y, Chajadine M, Alzaid F, Metghalchi S, et al. Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health. *Nat Med.* 2018;24(8):1113-20.
59. Jones ML, Martoni CJ, Ganopoulos JG, Labbe A, Prakash S. The human microbiome and bile acid metabolism: dysbiosis, dysmetabolism, disease and intervention. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(4):467-82.
60. Aranha MM, Cortez-Pinto H, Costa A, da Silva IB, Camilo ME, de Moura MC, et al. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(6):519-25.
61. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3318-28.
62. Mouzaki M, Wang AY, Bandsma R, Comelli EM, Arendt BM, Zhang L, et al. Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 2016;11(5):e0151829.
63. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):1006-11.
64. De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M. Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem.* 2003;278(40):39124-32.
65. Puri P, Liangpunsakul S, Christensen JE, Shah VH, Kamath PS, Gores GJ, et al. The circulating microbiome signature and inferred functional metagenomics in alcoholic hepatitis. *Hepatology.* 2018;67(4):1284-302.
66. Nobili V, Alisi A, Mosca A, Della Corte C, Veraldi S, De Vito R, et al. Hepatic farnesoid X receptor protein level and circulating fibroblast growth factor 19 concentration in children with NAFLD. *Liver Int.* 2018;38(2):342-9.
67. 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. *Lancet.* 2015;385(9972):956-65.
68. 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. *Lancet.* 2018;391(10126):1174-85.
69. Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(40):6911-8.
70. Tarantino G, Finelli C. Systematic review on intervention with prebiotics/probiotics in patients with obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Future Microbiol.* 2015;10(5):889-902.
71. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, et al. Randomised clinical trial: The beneficial effects of VSL#3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(11):1276-85.
72. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1090-5.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
73. Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of Probiotics on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(3):413-7.
74. Kobylak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, Kononenko L, Boccuto L, Kyriienko D, et al. A Multi-strain Probiotic Reduces the Fatty Liver Index, Cytokines and Aminotransferase levels in NAFLD Patients: Evidence from a Randomized Clinical Trial. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2018;27(1):41-9.
75. Nabavi S, Rafraf M, Somi MH, Homayouni-Rad A, Asghari-Jafarabadi M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *J Dairy Sci.* 2014;97(12):7386-93.
76. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(6):740-3.
77. Donmez N, Kisadere I, Balaban C, Kadiralieva N. Effects of traditional homemade koumiss on some hematological and biochemical characteristics in sedentary men exposed to exercise. *Biotech Histochem.* 2014;89(8):558-63.
78. Dugan CE, Aguilar D, Park YK, Lee JY, Fernandez ML. Dairy Consumption Lowers Systemic Inflammation and Liver Enzymes in Typically Low-Dairy Consumers with Clinical Characteristics of Metabolic Syndrome. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(3):255-61.
79. Firouzi S, Mohd-Yusof BN, Majid HA, Ismail A, Kamaruddin NA. Effect of microbial cell preparation on renal profile and liver function among type 2 diabetics: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:433.
80. Miccheli A, Capuani G, Marini F, Tomassini A, Pratico G, Ceccarelli S, et al. Urinary (1)H-NMR-based metabolic profiling of children with NAFLD undergoing VSL#3 treatment. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(7):1118-25.
81. Mobini R, Tremaroli V, Stahlman M, Karlsson F, Levin M, Ljungberg M, et al. Metabolic effects of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in people with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19(4):579-89.
82. Sepideh A, Karim P, Hossein A, Leila R, Hamdollah M, Mohammad EG, et al. Effects of Multistrain Probiotic Supplementation on Glycemic and Inflammatory Indices in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(6):500-5.
83. Sherf-Dagan S, Zelber-Sagi S, Zilberman-Schapira G, Webb M, Buch A, Keidar A, et al. Probiotics administration following sleeve gastrectomy surgery: a randomized double-blind trial. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(2):147-55.
84. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med.* 2019;25(7):1096-103.
85. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9066-71.
86. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017;23(1):107-13.
87. Grander C, Adolph TE, Wieser V, Lowe P, Wrzosek L, Gyongyosi B, et al. Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease. *Gut.* 2017.
88. Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhan M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(3):535-42.
89. Javadi L, Khoshbaten M, Safaiyan A, Ghavami M, Abbasi MM, Gargari BP. Pro- and prebiotic effects on oxidative stress and inflammatory markers in non-alcoholic fatty liver disease. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2018;27(5):1031-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
90. Manzhali E, Virchenko O, Falalyeyeva T, Beregova T, Stremmel W. Treatment efficacy of a probiotic preparation for non-alcoholic steatohepatitis: A pilot trial. *J Dig Dis*. 2017;18(12):698-703.
91. Mofidi F, Poustchi H, Yari Z, Nourinayyer B, Merat S, Sharafkhah M, et al. Synbiotic supplementation in lean patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot, randomised, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Br J Nutr*. 2017;117(5):662-8.
92. Ekhlesi G, Zarrati M, Agah S, Hosseini AF, Hosseini S, Shidfar S, et al. Effects of symbiotic and vitamin E supplementation on blood pressure, nitric oxide and inflammatory factors in non-alcoholic fatty liver disease. *EXCLI J*. 2017;16:278-90.
93. Ferolla SM, Couto CA, Costa-Silva L, Armiliato GN, Pereira CA, Martins FS, et al. Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*. 2016;8(7).
94. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol*. 2013;12(2):256-62.
95. Asemi Z, Aarabi MH, Hajjifari M, Alizadeh SA, Razzaghi R, Mazoochi M, et al. Effects of Synbiotic Food Consumption on Serum Minerals, Liver Enzymes, and Blood Pressure in Patients with Type 2 Diabetes: A Double-blind Randomized Cross-over Controlled Clinical Trial. *Int J Prev Med*. 2017;8:43.
96. Asgharian A, Askari G, Esmailzade A, Feizi A, Mohammadi V. The Effect of Symbiotic Supplementation on Liver Enzymes, C-reactive Protein and Ultrasound Findings in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Trial. *Int J Prev Med*. 2016;7:59.
97. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. *Bifidobacterium longum* with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(2):545-53.

Tableau 1 : Les principales études concernant la composition du microbiote chez les patients avec une NAFLD ou NASH

Références	Patients	Méthodes utilisées /type du prélèvement	Résultats
(11)	NAFLD : n=30 Témoins : n=30	Fèces 16S rARN	↑ <i>g_Lactobacillus</i> ↓ <i>g_Oscillibacter</i> ↑ <i>g_Robinsoniella</i> , ↑ <i>g_Roseburia</i> , ↑ <i>g_Dorea</i>
(9)	NASH : n=16 Témoins : n=22	Fèces 16S rARN	↓ <i>p_Firmicutes</i> ↓ <i>g_Faecalibacterium</i> ↑ <i>g_Anaesporobacter</i>
(10)	NAFLD : n=30 Témoins : n=22	Fèces 16S rARN	↓ <i>p_Lentisphaerae</i> ↓ <i>g_Allistipes</i> , ↓ <i>g_Odoribacter</i> , ↓ <i>g_Oscillibacter</i> ↓ <i>g_Flavonifractor</i> ↑ <i>g_Lactobacillus</i> , ↑ <i>g_Anaerobacter</i> ↑ <i>g_Clostridium XI</i> , ↑ <i>g_Streptococcus</i> ↑ <i>s_Escherichia coli</i>
(12)	Témoins : n=17 NASH : n=22 Obèses : n=11	Fèces qPCR	NASH vs témoins ↓ <i>p_Bacteroidetes</i> NASH vs obèses ↓ <i>p_Bacteroidetes</i> ↑ <i>g_Clostridium coccoides</i>
(13)	NAFLD F0/F1 : n=30 (dont NASH : n=10) Fibrose >F2 : n=27	Fèces 16S rARN	NASH : ↑ <i>g_Bacteroides</i> ↑ <i>g_Prevotella</i> , Fibrose F>2 ↑ <i>g_Bacteroides</i> , ↓ <i>g_Prevotella</i> , ↓ <i>g_Ruminococcus</i>
(16)	NAFLD n=11 Obèses n=26	Sang Fèces 16S rARN	Sang ↓ <i>p_Actinobacteria</i> ↑ <i>g_Sphingomonas</i> , ↑ <i>g_Bosea</i> ↓ <i>g_Variovorax</i> Fèces ↓ <i>p_Firmicutes</i> , ↓ <i>p_Actinobacteria</i> ↑ <i>p_Bacteroidetes</i> , ↑ <i>p_Fusobacteria</i>
(15)	NAFLD F0-F2 : 72 F3-F4 : 14	Séquençage « shotgun » (whole-genome) Fèces	Fibrose F3-F4 ↓ <i>p_Firmicutes</i> ↑ <i>p_Proteobacteria</i> ↓ <i>s_Ruminococcus obeum</i> , ↓ <i>s_R. obeum</i> , ↓ <i>s_E. rectale</i>
(14)	NAFLD=36 Obèses =17 Témoins =20	Fèces 16S rARN	↑ <i>p_Firmicutes</i> ↑ <i>g_Streptococcus</i>
(17)	NASH : n=22 Enfants Témoins : n=16	Fèces 16S rARN	↑ <i>p_Bacteroidetes</i> ↓ <i>p_Firmicutes</i> ↓ <i>p_Proteobacteria</i> , ↓ <i>p_Actinobacteria</i> ↑ <i>g_Prevotella</i> , ↑ <i>g_Allistipes</i> , ↑ <i>g_Oscillospira</i> ↑ <i>g_Ruminococcus</i> , ↑ <i>g_Blautia</i> ↑ <i>g_Coprococcus</i> ↑ <i>g_Eubacterium</i> , ↑ <i>g_Roseburia</i> , ↑ <i>g_Bifidobacterium</i> , ↑ <i>s_Escherichia coli</i>
	Obèses n=25		↑ <i>g_Proteobacteria</i> ↑ <i>s_Escherichia coli</i>
(19)	Témoins : n=54 Obèses : n=8 NAFLD : n=27 NASH : n=26	Fèces 16S rARN	Témoins vs les autres groupes ↓ <i>p_Actinobacteria</i> ↑ <i>p_Bacteroidetes</i> ↑ <i>g_Oscillospira</i>

↑ : augmentation de l'abondance, ↓ : diminution de l'abondance, effet, *p* : phylum, *f* : famille, *g* : genre, *s* : espèce

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tableau 2 : Les principaux essais cliniques utilisant des probiotiques chez l'homme dans les maladies hépatiques.

Population	Etude	Type	Intervention	Durée	N	Critères de jugement	Microbiote	Pays	Ref
NAFLD/NASH									
NAFLD (obésité morbide, après sleeve-gastrectomie)	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	Bio-25 (Supherb) : <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i>	6 mois	100 (1 :1)	(X) Stéatose (échographie), (X) Fibrose, (X) ASAT, (X) ALAT, (X) CRP, (X) leptine, (X) cytokeératin-18	Proteobacteria (Gammaproteobacteria), Actinobacteria (c_Coriobacteria, g_Collinsella)	Israël	(83)
NAFLD et diabète de type 2	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	Symbiter (14 souches) : <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Acetobacter</i>	8 sem	58 (1 :1)	(↓) fatty liver index (FLI), (X) élastométrie (LS), (↓) ASAT, (X) ALAT, (↓) GGT, (↓) TNF-α, (↓) IL-6	NA	Ukraine	(74)
NAFLD	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	Lactocare (Zist-takhmir Co., Tehran, Iran) : <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i>	8 sem	N=42 (1:1)	(↓) glucose, (↓) insuline, (↓) l'insulino-résistance, (↓) IL-6, (X) TNF-α	NA	Iran	(82)
NAFLD	Randomisé, double aveugle	PRO	yaourt probiotique (<i>L. acidophilus</i> La5 + <i>B. lactis</i> Bb12) vs. yaourt conventionnel	8 sem	N=72 (1:1)	(X) ASAT (↓) ALAT, (↓) cholestérol, (↓) LDL, (↓) TG, (↓) HDL, (X) glucose, (↓) BMI	NA	Iran	(75)
NAFLD (histologie)	Randomisé, double aveugle	PRO	<i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i>	3 mois	N=30 (1:1)	(↓) ASAT, (↓) ALAT, (↓) GGT, (X) TNFα, (↑) IL-6, (X) cholestérol, (X) LDL, (↓) HDL, (↓) TG, (X) BMI, (X) poids, (X) tour de tailles	NA	Espagne	(72)
NAFLD (enfants obèse)	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	<i>Lactobacillus GG</i>	8 sem	N=20 (1:1)	(↓) ALAT, (X) TNF-α, (↑) IL-6	NA	Italie	(76)
NAFLD (enfants obèse)	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	VSL#3	4 mois	N=44 (1:1)	(↓) BMI, (↓) ALAT, (X) TG	NA	Italie	(71)
NAFLD (enfants)	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	VSL#3 vs placebo	4 mois	N=31 (15/16)	(↓) BMI, (X) ASAT, ALAT, (X) cholestérol, (↑) LDL, (X) HDL, (↑) TG	NA	Italie	(80)
NAFLD (échographie) chez des enfants obèses	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	<i>L. acidophilus</i> ATCC B3208, <i>B. lactis</i> DSMZ, <i>B. bifidum</i> ATCC SD6576, <i>L. rhamnosus</i> DSMZ	12 sem	N=64 (1:1)	(↓) ASAT (↓) ALAT, (↓) cholestérol, (↓) LDL, (↓) triglycérides, (↓) tour de taille, (↓) stéatose (échographie), (X) poids, (X) IMC	NA	Iran	(73)

PRO : probiotiques, SYM : symbiotique, (↓) : diminution, (X) : pas d'effet, (↑) : augmentation, Δ : différence

Tableau 3 : Les principaux essais cliniques utilisant des probiotiques ou des symbiotiques chez l'homme avec évaluation de l'amélioration du bilan hépatique

Population	Etude	Type	Intervention	Durée	N	Critères de jugement	Microbiote	Pays	Ref
Diabète de type 2 / syndrome métabolique									
Diabète de type 2	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	10 ⁸ CFU vs. 10 ¹⁰ CFU <i>L. reuteri</i> DSMZ 17 938 vs. placebo	12 sem	N=73 (15/14/44)	(X) ASAT, (X) ALAT, (X) cholestérol, (X) LDL, (X) HDL, (X) TG, (X) CRP, (↑) BMI (group10 ⁸ CFU)	NA	Suède	(81)
Diabète type 2	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i>	12 sem	N=136 (1:1)	(↓) ALAT, (↓) ASAT	NA	Malaysia	(79)
Syndrome métabolique	Randomisé, en cross over	PRO	Produits laitiers faibles en graisses vs régime normal	16 sem	N=37	(X) BMI, (↓) ASAT, (↓) ALAT, (↓) GGT, (X) TNF α, (↑) CRP, (↓) cholestérol, (X) LDL, (↓) HDL, (↓) TG	NA	Etats Unis	(78)
Individus en surpoids ou obèses avec diabète type 2	Randomisé, double aveugle contre placebo	PRO	<i>Akkemansia muciniphila</i> 10 ¹⁰ CFU vivante ou pasteurisée vs placebo	3 mois	N=32	(↓) poids, (↓) insulémie, (↑) sensibilité insuline, (↓) cholestérol, (↓) ASAT, (↓) GGT placebo vs <i>A. muciniphila</i> pasteurisée	unaffected	Belgique	(84)
Hommes sédentaires	Randomisé, contre placebo	PRO	Lait fermenté (koumiss)	15 j	N=18 (1:2)	(↓) ASAT, (↓) ALAT, (↓) GGT, (X) cholestérol, (↑)TG	NA	Turquie	(77)
Diabète type 2	Randomisé, en cross over	SYM	<i>L. sporogenes</i> inuline	6 sem	N=124 (1:1)	(X) ASAT, (X) ALAT, (X) BMI	NA	Iran	(95)

PRO : probiotiques, SYM : symbiotique, (↓) : diminution, (X) : pas d'effet, (↑) : augmentation, Δ : différence

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tableau 4 : Les principaux essais cliniques utilisant des symbiotiques chez l'homme dans les maladies hépatiques

Population	Etude	Type	Intervention	Durée	N	Critères de jugement	Microbiote	Pays	Ref
NAFLD/NASH									
NASH	Randomisé, en ouvert	SYM	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L. bulgaris</i> , <i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i> , FOS	12 sem	N=75 (38 : 37)	(↓) ALAT, (↓) ASAT, (X) GGT, (↓) cholestérol, (↓) élastometrie, (↓) IMC	Profil différent après traitement (cultures bactériennes)	Ukraine	(90)
NAFLD (IMC normal)	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	Protexin (Probiotics Int Ltd) : <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , FOS (125 mg)	28 sem	N=42 (1:1)	(↓) Δ stéatose, (↓) Δ elastometric, (↓) glucose, (↓) TG, (↓) ASAT, (↓) NF-κB p65, (↓) Hs-CRP, (X) BMI	NA	Iran	(91)
NASH (histologie)	Randomisé	SYM	<i>L. reuteri</i> + guar gum + inulin	3 mois	N=50 (S : 27 vs T : 23)	(↓) stéatose (IRM), (↓) poids, (↓) IMC, (↓) tour de tailles, (X) perméabilité intestinale, (X) LPS (X) fibrose		(Brasile)	(93)
NASH (histologie)	Randomisé, en ouvert	SYM	Lepicol formula : <i>L. plantarum</i> , <i>L. desibrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i> , FOS	6 mois	N=20 (1:1)	(↓) TG intra hépatiques (spectroscopic RM), (↓) ASAT, (X) glucose, (X) lipides, (X) BMI, (X) tour de tailles	NA	Chine (Hong Kong)	(94)
NAFLD	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	Protexin : <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , FOS	28 semaines	N=52(1:1)	(↓) ASAT, (X) ALAT, (↓) GGT, (X) TNFa, (↓) CRP	NA	Iran	(88)
NAFLD	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	Familaet : <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i> FOS	8 sem	N=74 (1:1)	(X) ASAT, (X) ALAT, (X) CRP, (X) BMI	NA	Iran	(96)
NAFLD	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. bulgaricus</i> , FOS	8 sem	N=30 (1:1)	(↓) ASAT, (↓) ALAT, (↓) TNFa, (X) BMI	NA	Iran	(92)
NASH	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	<i>B. longum</i> FOS	24 sem	N=66 (1:1)	(↑) BMI, (↑) ASAT, (↑) ALAT, (↓) TNFa, (↓) CRP, (↓) cholestérol, (↓) LDL, (↑) HDL, (↓) TG	NA	Italie	(97)
NAFLD	Randomisé, double aveugle contre placebo	SYM	<i>B. longum</i> + <i>L. acidophilus</i> vs. inuline vs. symbiotique vs. placebo	3 mois	N=75 (1:1:1:1)	(↓) ASAT, (↓) ALAT, (↓) BMI, (X) GGT	NA	Iran	(89)

PRO : probiotiques, SYM : symbiotique, (↓) : diminution, (X) : pas d'effet, (↑) : augmentation, Δ : différence

II. Hépatotoxicité des inhibiteurs de tyrosine kinase : Revue de littérature

*Review article***Multikinase inhibitor-induced liver injury in patients with cancer:****a review for clinicians**

Camille Houron^{1,2}, Marie Danielou^{1,3}, Olivier Mir⁴, Bernard Fromenty⁵, Gabriel Perlemuter^{1,2,3}, Cosmin Sebastian Voican^{1,2,3}

¹ *Faculté de Médecine Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, F-94276, Le Kremlin-Bicêtre, France*

² *INSERM U996, DHU Hepatinov, Labex LERMIT, F-92140, Clamart, France*

³ *Service d'Hépatogastroentérologie et Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère, AP-HP, Université Paris-Saclay, F-92140, Clamart, France*

⁴ *Gustave Roussy Cancer Campus, Department of Ambulatory Care, F-94805, Villejuif, France*

⁵ *INSERM, INRA, Univ Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer), UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000, Rennes, France*

Correspondence to:

Pr Gabriel Perlemuter

Service d'Hépatogastroentérologie et Nutrition, Hôpital Antoine-Béclère

157 rue de la Porte de Trivaux, Clamart cedex F-92141, France

Phone: +33 1 45 37 43 69 Fax: +33 1 40 94 06 56

gabriel.perlemuter@aphp.fr

Abstract

Background. Multikinase inhibitors (MKI) are molecular targeted agents which have revolutionized management of cancer. However, there is a paucity of data regarding MKI-related liver injury risk and clinical guidelines for the management of liver toxicity in patients receiving MKI for cancer are scarce.

Design. We conducted a PubMed search of articles in English published from January 2000 to December 2018 related to hepatic toxicity of the 29 FDA-approved MKI at doses used in clinical practice: Alectinib, Afatinib, Axitinib, Bosutinib, Cabozantinib, Ceritinib, Cobimetinib, Crizotinib, Dabrafenib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Ibrutinib, Imatinib, Lapatinib, Lenvatinib, Osimertinib, Nilotinib, Nintedanib, Pazopanib, Ponatinib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib, Trametinib, Vandetanib, Vemurafenib, Everolimus and Temozolomide. The search terms were International Non-proprietary Name of each agent cross-referenced with «hepatotoxicity», «hepatitis», «hepatic adverse event» or «liver failure», and «phase II clinical trial», «phase III clinical trial» or «case report».

Results. From these data, description of MKI-related liver events, grading of hepatotoxicity risk and recommendations for management are given for different MKI molecules.

Conclusion. All MKI may potentially cause liver injury which is sometimes irreversible. As there is still no strategy available to prevent MKI-related hepatotoxicity, early detection remains crucial. Surveillance of liver function tests during treatment may help early detection of hepatic adverse events. Furthermore, exclusion of potential causes of hepatic injury is essential to avoid unnecessary MKI withdrawal.

Key words: multikinase inhibitor, drug-induced liver injury, hepatotoxicity.

Introduction

Drug induced liver injury (DILI) is the fourth most common cause of liver damage in Western countries and the most frequent reason of market withdrawal of a drug [1, 2]. Incidence of DILI is expected to rise in the context of increasing drug availability and prescription. Most drugs induce idiosyncratic hepatotoxicity (called idiosyncratic DILI) traditionally considered unpredictable based on dose or pharmacological properties of the molecule [3]. Although the pathogenesis is largely unknown, DILI is probably the consequence of interactions between host susceptibility, environmental factors and drug pharmacological properties. In the absence of specific tests for DILI, the diagnosis relies on circumstantial evidence and exclusion of other causes of liver damage.

Emergence of innovative therapies such as molecular targeted agents has revolutionized management of cancer. Among these molecules, Multikinase inhibitors (MKI) block phosphorylation cascades involved in many of the hallmark phenotypes of tumor biology, including proliferation, survival, motility, angiogenesis, and evasion of anticancer immune responses [4]. Theoretically, their targeted action decreases the risk of adverse events. Nevertheless, MKI use has been associated with serious toxic effects such as skin toxicity, cardiotoxicity or hepatotoxicity [5-7]. However, there is a paucity of data regarding MKI-related hepatotoxicity risk and clinical guidelines for the management of liver toxicity in patients receiving MKI for cancer are scarce. Early diagnosis of DILI is essential as treatment continuation may potentially cause acute liver failure with 60 to 80% mortality [8]. On the other hand, an erroneous diagnosis of DILI may lead to unnecessary drug withdrawal which may affect the prognosis of patients with cancer. We therefore performed an exhaustive review of published data on hepatic adverse events and DILI related to MKI use, and discuss the issue of hepatotoxicity during MKI treatment for cancer.

Method

We conducted a PubMed search of articles in English published from January 2000 to December 2018 related to hepatic toxicity of the 29 FDA-approved MKI at doses used in clinical practice: Alectinib, Afatinib, Axitinib, Bosutinib, Cabozantinib, Ceritinib, Cobimetinib, Crizotinib, Dabrafenib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Ibrutinib, Imatinib, Lapatinib, Lenvatinib, Osimertinib, Nilotinib, Nintedanib, Pazopanib, Ponatinib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib, Trametinib, Vandetanib, Vemurafenib, Everolimus and Temsirolimus. The search terms were International Non-proprietary Name of each agent cross-referenced with «hepatotoxicity», «hepatitis», «hepatic adverse event» or «liver failure», and «phase II clinical trial», «phase III clinical trial» or «case report». The results of the literature search are presented in Figure 1. Clinical trials reporting hepatic adverse events occurring under treatment and including a proper number of patients (20 patients or more, except for Bosutinib where the threshold was fixed at 10 patients due to a lack of data) were retained. Case reports describing DILI were considered suitable for review, by author consensus, based on exclusion of other causes of liver injury and the use of validated scales for drug imputability assessment. If necessary, drug imputability was reassessed by authors based on information provided in the manuscripts. Phase I clinical trials were excluded as we aimed to review hepatotoxicity associated with therapeutic doses. All relevant articles in the reference lists were also considered for review.

The potential for causing DILI was assessed for each agent on the basis of five criteria: total number of published cases of DILI, number of published cases of severe liver injury leading to death, significant abnormalities of liver function tests (LFT) in clinical trials, namely ALT or AST >5xULN (upper limit of normal), the existence of clinical trials describing cases of DILI, and hepatotoxicity demonstrated by published experimental studies.

Results

Epidemiology. MKI are often used in patients with liver metastases. Thus, interpretation of LFT abnormalities may be difficult in this context, as it may be due to hepatic extension of the cancer. In most clinical trials, LFT are considered as “adequate” when aminotransferases are lower than 2.5xULN in the absence of hepatic metastases or lower than 5xULN if hepatic metastases, and bilirubin level <1.5xULN [9]. However, baseline LFT are often unknown in case-reports or not mentioned in clinical trials. This is an important issue when assessing MKI imputability as patient’s previous liver state is a crucial factor to determine the causal role of drugs. Severe hepatic events (grade 3-4), defined as aminotransferases >5xULN, are detected in 0 to 29% of patients treated with MKI in clinical trials (table 1). The heterogeneity between publications in the incidence of aminotransferase increase remains high even for the same agent. For example, severe hepatic events are described in 4 to 19% of patients treated with Bosutinib and in 1 to 11% of those receiving Gefitinib (table 1). No case of DILI has been reported for: Afatinib, Axitinib, Cabozantinib, Ceritinib, Cobimetinib, Dabrafenib, Lenvatinib, Nilotinib, Ponatinib, Trametinib, Vandetanib, Everolimus and Temezirolimus. The only data regarding hepatotoxicity of these agents is the succinct description in clinical trials: increased aminotransferases levels associated or not with high bilirubin levels. Overall, the molecules for which the highest frequency of severe aminotransferase abnormalities (>5xULN) and reported DILI are Crizotinib, Erlotinib, Gefitinib, Imatinib, Lenvatinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib and Vemurafenib-Ipilimumab association (table 1 and 2). Those with apparently lower risks are Afatinib, Alectinib, Axitinib, Cabozantinib, Cobimetinib, Dabrafenib, Dasatinib, Ibrutinib, Ponatinib, Trametinib, Vandetanib, Vemurafenib alone, Everolimus and Temezirolimus (table 1 and 2) [10-131].

Clinical presentation and laboratory tests. MKI-induced liver injury includes various biological and clinical presentations, ranging from isolated abnormalities of LFT to nonspecific

symptoms such as anorexia, asthenia, nausea, abdominal pain, arthralgia, and rash, and also to more specific symptoms such as jaundice, progressive liver failure with loss of hepatocellular function, hepatic encephalopathy and death. In most cases, patients are completely asymptomatic and the increased aminotransferase level revealed by routine blood tests is the only element that rises a suspicion of MKI-related hepatotoxicity.

Limited data is available in MKI clinical trials. When provided, the latency of hepatotoxicity varies between the first cycle of treatment for Crizotinib and several months for molecules such as Bosutinib or Imatinib, with most cases occurring during the first 2 months of treatment (table 2). Significant liver toxicity generally consists of aminotransferase increase $>5xULN$. Nevertheless, associated hyperbilirubinemia has been described for Cobimetinib, Crizotinib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Imatinib, Lenvatinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib, Sunitinib and Vandetanib-Ipilimumab association. LFT return to baseline upon drug withdrawal except for Lenvatinib, Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib for which liver failure and death have been observed. Of note, liver metastases are present in up to fifty percent of patients in clinical trials. Therefore, in patients with secondary or primary liver tumors, we cannot distinguish a true MKI-induced liver enzyme increase from the disease itself. Abnormal LFT in patients treated with MKI should therefore be interpreted with caution.

A more detailed description of MKI-related hepatotoxicity is provided by case reports. Latency varies between one week for Erlotinib, Sorafenib, Regorafenib, and more than six months for Gefitinib, Dasatinib, Ibrutinib, Imatinib, Nindetanib, Sunitinib. DILI related to MKI use is of hepatocellular type (aminotransferase elevation with no or mild alkaline phosphatase increase), but cases of mixed DILI (elevation of both aminotransferases and alkaline phosphatase) were published for Dasatinib, Imatinib, Pazopanib, Sorafenib and Vemurafenib. Bilirubin elevation meeting Hy's law criteria (hepatocellular type injury seen concurrently with bilirubin $>2xULN$) was reported for Crizotinib (2 cases - death), Erlotinib (3 cases - death),

Ibrutinib (2 cases - recovery), Imatinib (5 cases – 1 death), Lapatinib (1 case - recovery), Pazopanib (2 cases - recovery), Regorafenib (5 cases – 2 death), Sorafenib (3 cases – 1 death), Sunitinib (2 cases - death) and Vemurafenib-Ipilimumab association (2 cases - recovery) (table 2).

Histological features. Liver biopsy does not reveal histological characteristics specific for MKI-related DILI and therefore it is not mandatory. Nevertheless, liver histology may orient diagnostic of DILI (immuno-allergic or metabolic DILI) and rule out other causes of hepatic injury. Liver biopsy performed in three published cases of Erlotinib or Gefitinib-induced hepatotoxicity revealed elements of an immuno-allergic (hypersensitivity) mechanism: active hepatitis with portal inflammation (lymphocyte, plasma cell and neutrophil infiltration) and bridging necrosis [132-134]. For Imatinib-induced hepatic injury, liver histology is described in twelve case reports [135-146]. Bridging necrosis (mainly centrilobular) associated with portal inflammatory infiltrates containing lymphocytes, plasma cells and many eosinophils are found, suggesting a hypersensitivity mechanism. In cases of mixed DILI histological cholestasis is present. Bridging fibrosis and acute viral hepatitis-like histological features (focal necrosis, lymphocyte infiltration around necrosis zones and on sinusoids) were described in two cases of Imatinib-induced hepatotoxicity [135, 136, 139, 144]. Histological features suggesting hypersensitivity DILI (bridging necrosis, hepatocellular dropout around the centrilobular areas and portal eosinophil infiltration) are shown in one case of Lapatinib-induced hepatotoxicity [147]. For Ibrutinib and Pazopanib-induced liver injury, histology showed cholestatic hepatitis with eosinophil infiltration within the portal tracts [126, 148]. Cholestatic hepatitis in association with granulomatous inflammation and eosinophil infiltrate was described in a case of Vemurafenib-related DILI [149]. Histological lesions compatible with metabolic (centrilobular hepatic necrosis with confluent destruction of acinar zone 3 and scarce inflammation) or immuno-allergic DILI (bridging necrosis with portal lymphocyte and plasma cell infiltration)

are described in eight cases of hepatotoxicity to Regorafenib, Sorafenib and Osimertinib [129, 150-155]. The only case report of Sunitinib-induced hepatotoxicity with available liver biopsy showed liver invasion by cancerous cells and therefore histological features may not be related to DILI. In a recently reported case of Alectinib-induced hepatitis, liver biopsy showed bridging necrosis with inflammatory infiltrate containing lymphocytes, macrophages and plasma cells [125].

Imputability assessment. No specific markers are available for diagnosis of DILI related to MKI use. Furthermore, MKI-associated liver injury can mimic almost all known causes of hepatic diseases (viral hepatitis, non-alcoholic fatty liver disease, alcoholic liver disease, autoimmune hepatitis, metabolic diseases, biliary tract obstruction, hepatic ischemia, vascular obstruction, sepsis) and consequently is diagnosed by ruling out all other possible causes [156]. In order to overcome this problem, RUCAM (Roussel Uclaf Causality Assessment Method) causality assessment score can be used for evaluation of MKI imputability. The RUCAM score is the most largely used method for assessing causality in hepatotoxicity by different drugs and includes several criteria such as: the event chronology, description of first clinical signs, results of LFT after drug withdrawal (a 50% decrease in liver enzyme levels following withdrawal of the suspected culprit drug is highly suggestive of DILI), concomitant medication (including self-medication, phytotherapy products, and illicit drugs), other potential causes, previous case reports of DILI, nature of the drug, drug dosage or alcohol consumption. Although drug rechallenge should be avoided because of the risk of severe hepatic failure, deliberate or inadvertent drug rechallenge resulting in a deterioration of LFT provides strong evidence for drug imputability. Positive drug rechallenge has been described for Crizotinib (4 cases), Erlotinib (2 cases), Gefitinib (6 cases), Imatinib (10 cases), and Osimertinib (1 case) (table 2).

Management and outcomes. MKI-induced liver injury is generally of the hepatocellular type and more rarely of the mixed type (table 2). In the hepatocellular type, there is an increase

in aminotransferase levels with no or mild alkaline phosphatase increase that normalized within 10 days to 5 month from drug withdrawal in three quarters of cases. For certain molecules, such as Crizotinib, reintroduction (rechallenge) at a lower dosage (250 mg daily versus 250 mg twice daily) was possible without aminotransferase increase. For Osimertinib, a successful reintroduction without dose reduction was described after oral desensitization. A rechallenge was performed in 25 published cases of MKI-induced hepatotoxicity resulting in recurrence of LFT abnormalities (table 2). Nevertheless, rechallenge should be performed under strict surveillance of LFT due to the risk of recurrent DILI and liver failure (table 2). Cross-toxicity has not been described for MKI, and the switch to Erlotinib was a safe option for patients developing Gefitinib-associated DILI (table 2). Dabrafenib and Trametinib combination was successfully introduced in a patient developing Vemurafenib-induced severe liver injury [157]. Furthermore, oral steroid therapy was successfully used in 9 cases of Imatinib-related hepatotoxicity and 5 cases of Vemurafenib-Ipilimumab combination allowing drug reintroduction and/or LFT recovery [131, 138]. Oral Prednisone started at a daily dose of 25-30 mg and gradually tapered over 2 to 8 months may therefore be an option in patients developing MKI-associated DILI with immuno-allergic characteristics (rash and/or eosinophilia). Two cases of cirrhosis have been reported after 18 and 24 month of Imatinib treatment [144, 158]. In these patients, no other cause of liver disease was found.

In clinical trials, liver toxicity related to MKI agents is often transient and non-severe. The presence of jaundice (serum bilirubin level >2xULN) in a context of hepatocellular pattern of DILI (Hy's law) is associated with a mortality rate of at least 10% independent of the culprit molecule [159]. However, the prevalence of LFT abnormalities meeting Hy's law criteria is not reported in clinical trials. Nevertheless, fatal cases of MKI-related hepatotoxicity have been mentioned for Lenvatinib (3 cases) [160, 161], Pazopanib (2 cases) [162], Sorafenib (7 cases) [91, 92, 94, 95] and Sunitinib (9 cases) [99, 100]. In these cases, the imputability of MKI drug

was considered possible or probable by investigators without further detail. Of note, fatal hepatotoxicity attributed to Sorafenib and Sunitinib was reported in patients with hepatocellular carcinoma. Therefore, liver failure may be the result of cancer progression or underlying liver disease such as cirrhosis. When the criteria of Hy's law are met, the culprit MKI agent should be withdrawn immediately. Cases reports of fatal liver failure have also been published for Crizotinib, Erlotinib, Imatinib, Pazopanib, Regorafenib, Sorafenib and Sunitinib.

Pathophysiology of MKI-induced hepatotoxicity. The mechanism of liver injury associated with MKI use is commonly immuno-allergic, and metabolic-idiosyncratic mechanism appears to be less frequent (table 2). In most case reports, we note an early onset of DILI between several days and two months after the beginning of MKI treatment (table 2). In these cases with short latency, clinico-biological (rash, fever, blood eosinophilia) and histological (hepatic eosinophilia) elements of hypersensitivity may be present suggesting an immuno-allergic mechanism in 12% of cases. A longer latency period (up to 16 month for Imatinib) has been described for Imatinib, Gefitinib, Dasatinib and Sunitinib, suggesting a metabolic-idiosyncratic mechanism (table 2).

The risk of MKI-induced liver injury is likely determined by drug properties, including the generation of toxic reactive metabolites, host factors and their interactions [163]. Most MKI are metabolized by cytochrome P450 (CYP450) pathway. Therefore, variations in CYP450 isoenzyme activity may critically influence the development of DILI by modifying the level of exposure to the reactive metabolites and/or altering the disposition of the MKI molecule. Gefitinib is metabolized in the liver by CYP3A4, CYP2D6, CYP3A5, and CYP1A1. It was suggested that CYP2D6 is specifically used as an alternative pathway for gefitinib metabolism [164]. CYP2D6 deficiency may therefore favor gefitinib-induced liver injury in patients taking CYP3A4-inhibitory drugs [164]. Lapatinib undergoes extensive metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 generating reactive metabolites which may covalently modify cellular proteins,

potentially leading to immune-mediated DILI [165, 166]. Furthermore, the presence of human leukocyte antigen (HLA)-DQA1*02:01 allele was associated with a higher risk of Lapatinib-induced liver injury in woman with advanced breast cancer [166]. It was also proved that HLA-B*57:01 carriage confers higher risk of aminotransferase elevation in patients receiving Pazopanib [167]. Hepatotoxicity of Lapatinib and Pazopanib may therefore be attributed to the interaction of CYP450 polymorphism and host immune status. Despite a low liver toxicity risk as monotherapy, Vemurafenib-Ipilimumab combination was associated with hepatotoxicity in 60% of patients in a phase 1 clinical trial [131]. Ipilimumab is an immune checkpoint inhibitor which swings the balance towards immune stimulation and might therefore favour an immuno-allergic DILI to Vemurafenib.

A recent study showed that Erlotinib-induced hepatocyte apoptosis *in vitro* is mediated by mitochondrial damage [168]. Regorafenib can also induce hepatocyte necrosis *in vitro* at clinically relevant concentrations, by uncoupling liver mitochondrial respiration and inducing autophagy [169]. Furthermore, Imatinib, Lapatinib and Sunitinib increase reactive oxygen species, impair cellular oxygen consumption, alter glycolysis, and induce apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [170]. Overall, these experimental data suggest that mitochondrial injury is one possible mechanism for hepatotoxicity related to MKI use. In keeping with this assumption, different MKI inducing metabolic-idiosyncratic hepatotoxicity such as Gefitinib, Sunitinib and Sorafenib are able to impair mitochondrial function in isolated rodent liver mitochondria at clinically relevant concentrations [171, 172].

Adenosine triphosphate-binding cassette transporters ABCG2 and ABCB1 are involved in the efflux of xenobiotics from hepatocytes into the bile. It was recently showed that concomitant use of anti-acid-secreting agents such H2 antagonists and proton pump inhibitors is associated with an increased risk of gefitinib-induced liver toxicity [173]. Gefitinib is known to be a substrate of ABCG2 and ABCB1 expressed in hepatocytes [174]. Therefore, inhibition

of ABCG2 and ABCB1 by proton pump inhibitors and H2 agonist, respectively, may theoretically increase the concentration of Gefitinib in the liver, contributing to hepatotoxicity.

Sorafenib and Regorafenib are metabolized primarily by oxidative metabolism in the liver via CYP3A4 pathway and glucuronidation mediated by uridine diphosphate-glucuronosyl-transferase 1A (UGT1A) 9 pathway [175]. Both drugs potently inhibit UGT1A 9 and 1 which contribute to the hyperbilirubinemia observed in patients treated with Sorafenib and Regorafenib [176].

Results for individual MKI agents are summarized in Table 2 [7, 21, 24-28, 115-124, 132-148, 150-155, 158, 160, 161, 164, 167, 173, 177-224].

Discussion

Data on DILI from MKI drugs are scarce, and there is no recent review addressing MKI hepatic events. Nevertheless, clinical trials suggest that all MKI agents are associated with a risk of hepatotoxicity, defined as an increase in aminotransferases levels with or without high bilirubin levels. For some MKI agents such as Bosutinib, resolution of LFT abnormalities is observed without drug discontinuation or dose reduction. Such a phenomena of hepatic tolerance to drug toxicity has already been described for Isoniazide [225] and Tacrine [226] and Agomelatine [227]: these drugs can initially induce aminotransferases augmentation which is thereafter reversible despite treatment continuation. The "adaptive phenomena", which is not synonymous with DILI, is probably underestimated as drug-induced aminotransferase elevation usually results in treatment withdrawal.

Detection of DILI during pre-marketing clinical trials is a difficult challenge due to the lack of good predictive biomarkers and the small number of patients treated relative to the frequency of DILI. In order to guide drug development research, FDA proposed indicators of the drug potential for severe hepatotoxicity: elevation of aminotransferase values to $> 3xULN$ with reference to placebo; any marked elevations of aminotransferases to $> 5xULN$ in the treatment group without a corresponding increase in the placebo group; one or more cases of bilirubin titres increasing to $> 2xULN$ associated with aminotransferase levels at $> 3xULN$ (Hy's law) with no other explanation [228]. The presence of at least one of these criteria may indicate a significant risk of hepatic toxicity, and cases of severe DILI are expected in post-marketing settings. Of note, the definition of hepatic event severity in clinical trials involving MKI drugs relies on the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) developed by the Cancer Therapy Evaluation Program of the National Cancer Institute (NCI) [229]. According to these criteria, elevation of aminotransferase $> 5xULN$ is defined as severe hepatic event. However, it should be mentioned that asymptomatic aminotransferase increase

without jaundice cannot be considered severe hepatotoxicity. A more reliable scale for grading severity of liver injury related to drug use was proposed by Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) [230]. In the DILIN scale, severity of hepatic events relies on the presence of jaundice, signs of hepatic or other organ failure, necessity of hospitalization, and death. The presence of these severity criteria is not mandatory in the CTCAE definition. Therefore, the use of the CTCAE criteria in MKI clinical trials may overestimate the severity of MKI-induced hepatotoxicity. It should be also mentioned that LFT abnormalities do not necessary reflect drug-related toxicity in MKI treated patients. Liver metastases are often present in cancer patients and therefore perturbations of LFT should be interpreted with caution in order to avoid inappropriate MKI withdrawal. Although serum aminotransferase activities are probably a poor indicator of DILI for most drugs, it still remains the gold standard that should be used to monitor patients. Studies of various individual gene polymorphisms may allow the identification of more reliable indicators of the risk of MKI-related DILI for use in the future. Of note, pre-existing chronic liver disease does not appear to favour MKI-induced hepatotoxicity, but once developed DILI may have devastating consequences in patients with reduced baseline hepatic reserve.

Drug-drug interactions should be considered, so it would be advisable to avoid coprescriptions that may target or inhibit the same CYP450 pathway in patients treated with MKI. Immuno-allergic mechanism may play a role as suggested by the association between lapatinib and pazopanib-induced liver injury, and HLA-DQA1*02:01 and HLA-B*57:01 carriage, respectively. Nevertheless, clinical relevance of CYP450 pathway and HLA typing in MKI-treated patients has not been proved. DILI related to MKI use is of idiosyncratic type and generally considered dose-independent. However, Crizotinib or Nintedanib were successfully reintroduced at lower doses in most patients developing hepatotoxicity (table 2). Hence, besides

immuno-allergic mechanisms, some MKI can also induce metabolic idiosyncratic cytotoxicity (table 2).

The strengths of this review include the exhaustive analysis of published cases of MKI-related DILI and the evaluation of LFT abnormalities described in clinical trials.

The main limitation of this review is related to publication biases that have to be considered in the analysis of the literature. Any analysis involving case reports is subject to the inherent bias toward the publication of more severe MKI-related hepatic toxicity. Furthermore, the number of reported cases of DILI is inevitably higher for the most frequently used MKI agents, which may tend to indicate, falsely, a higher hepatotoxicity risk. Finally, alternative causes of liver injury are incompletely ruled out in a considerable amount of clinical trials or case reports.

Recommendations for clinical practice. Early detection and drug withdrawal can prevent severe hepatic failure. A correct diagnosis is capital to avoid inappropriate therapy discontinuation. Therefore, LFT assessment at baseline can provide an estimation of reference values, identify any underlying liver injury and help in the interpretation of abnormal LFT identified during MKI treatment.

Weekly monitoring of LFT during the first 2 months of treatment should be performed when using a MKI with a greater risk of hepatotoxicity (table 2; figure 2). LFT assessment may then be continued on monthly bases. For MKI with apparently lower liver toxicity risk (table 2; figure 2), monthly monitoring of LFT is reasonable.

The cut-offs of LFT for MKI withdrawal are difficult to define. In cancer patients, LFT abnormalities may be the manifestation of liver metastases and sometimes liver biopsy should be discussed before MKI withdrawal to rule out cancer invasion. Liver biopsy may also help differential diagnosis in cases of hepatotoxicity with low-to-moderate drug imputability. The

MKI treatment should be promptly discontinued when serum aminotransferase levels are $>5\times\text{ULN}$ or if criteria for Hy's law are present. In case of moderate aminotransferase elevation $<5\times\text{ULN}$, LFT monitoring should be performed twice a week and MKI treatment may be continued. For patients with high baseline aminotransferase levels, drug discontinuation should be done when serum aminotransferase levels are > 5 times the baseline value. It has to be mentioned that MKI inhibiting UGT1A 1 (sorafenib and regorafenib) impair elimination of bilirubin, with a resulting increase in unconjugated bilirubin mimicking the criteria for Hy's law. In patients with long exposure to MKI molecules, such as Imatinib, non-invasive evaluation of hepatic fibrosis by transient elastometry once a year may be useful due to the risk of developing cirrhosis (table 2). Figure 2 proposes an algorithm for management of patients with suspected MKI-induced liver toxicity.

Permanent discontinuation may become necessary but this poses a dilemma if the tumour is responsive to the MKI concerned. Therefore, exhaustive investigations should be performed to exclude potential causes of liver injury and to confirm the diagnosis of MKI-related DILI, including serological tests for hepatotropic viruses (hepatitis A, B, C, and E viruses, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus), autoantibody tests, iron and copper levels, abdominal ultrasonography and even liver biopsy. Hepatitis E virus infection is not considered in the differential diagnosis of DILI in most published cases of MKI-induced liver damage. It was shown that acute hepatitis E is the cause of some cases of liver disease that were initially suspected to be DILI [231]. Hepatitis E testing should therefore be performed in all cases of suspected MKI-induced hepatotoxicity, particularly if the clinical features are compatible with acute viral hepatitis.

Surveillance of LFT (ALT, alkaline phosphatase, and bilirubin) is essential until normalization or return to baseline values. In most cases, LFT improves after drug discontinuation, but hepatic injury may sometimes persist for several months. Once LFT return

to baseline, patients should be considered for treatment with another MKI molecule due to the lack of cross-hepatotoxicity between the MKI (table 2). Rechallenge should be avoided in cases of definite DILI due to the risk of hepatic failure. If a rechallenge is decided, the MKI agent must be reintroduced under strict surveillance of LFT. Concomitant administration of corticoids at a daily dose of 0.5 mg/kg may be an option in patients for which Imatinib rechallenge is attempted. Future investigations are required in order to determine whether N-acetylcysteine is an efficient preventive or curative treatment for MKI-induced hepatotoxicity [232].

Conclusions

All MKI molecules may potentially cause liver damage which is sometimes irreversible. As there is still no strategy available to prevent MKI-related hepatotoxicity, early detection remains crucial. Surveillance of LFT during treatment may help early detection of hepatic adverse events. It is essential that potential causes of hepatic injury be excluded to avoid unnecessary MKI withdrawal.

Conflict of interest statement

OM acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen, Lundbeck, Pfizer, Roche, Servier, Vifor Pharma; as a speaker for Eli-Lilly, Roche, Servier, Medscape and PrimeOncology; and owns stock options from Amplitude Surgical, Transgene and Ipsen. GP received travel funds from Janssen and Gilead, consulting fees from Bayer, Biocodex, Roche, Gilead, Pierre Fabre, and Servier, and royalties from Elsevier-Masson, Solar, Flammation/Versilio, and John Libbey Eurotext. CH, MD, BF and CSV declare that they have no competing interests.

References

1. Schuster D, Laggner C, Langer T. Why drugs fail--a study on side effects in new chemical entities. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3545-3559.
2. Temple RJ, Himmel MH. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *Jama* 2002; 287: 2273-2275.
3. Voican CS, Corruble E, Naveau S, Perlemuter G. Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. *Am J Psychiatry* 2014; 171: 404-415.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
5. Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 470-481.
6. Dong J, Chen H. Cardiotoxicity of Anticancer Therapeutics. *Front Cardiovasc Med* 2018; 5: 9.
7. Shah RR, Morganroth J, Shah DR. Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors: clinical and regulatory perspectives. *Drug Saf* 2013; 36: 491-503.
8. Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL et al. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008; 47: 1401-1415.
9. Watkins PB, Merz M, Avigan MI et al. The clinical liver safety assessment best practices workshop: rationale, goals, accomplishments and the future. *Drug Saf* 2014; 37 Suppl 1: S1-7.
10. Ioka T, Okusaka T, Ohkawa S et al. Efficacy and safety of axitinib in combination with gemcitabine in advanced pancreatic cancer: subgroup analyses by region, including Japan, from the global randomized Phase III trial. *Jpn J Clin Oncol* 2015; 45: 439-448.

11. Bondarenko IM, Ingrosso A, Bycott P et al. Phase II study of axitinib with doublet chemotherapy in patients with advanced squamous non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 339.
12. Karam JA, Devine CE, Urbauer DL et al. Phase 2 trial of neoadjuvant axitinib in patients with locally advanced nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2014; 66: 874-880.
13. Belani CP, Yamamoto N, Bondarenko IM et al. Randomized phase II study of pemetrexed/cisplatin with or without axitinib for non-squamous non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 290.
14. Rini BI, Melichar B, Ueda T et al. Axitinib with or without dose titration for first-line metastatic renal-cell carcinoma: a randomised double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1233-1242.
15. Tomita Y, Uemura H, Fujimoto H et al. Key predictive factors of axitinib (AG-013736)-induced proteinuria and efficacy: a phase II study in Japanese patients with cytokine-refractory metastatic renal cell Carcinoma. *Eur J Cancer* 2011; 47: 2592-2602.
16. Taylor JW, Dietrich J, Gerstner ER et al. Phase 2 study of bosutinib, a Src inhibitor, in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2015; 121: 557-563.
17. Moy B, Neven P, Lebrun F et al. Bosutinib in combination with the aromatase inhibitor letrozole: a phase II trial in postmenopausal women evaluating first-line endocrine therapy in locally advanced or metastatic hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Oncologist* 2014; 19: 348-349.
18. Kantarjian HM, Cortes JE, Kim DW et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2014; 123: 1309-1318.

19. Gambacorti-Passerini C, Cortes JE, Lipton JH et al. Safety of bosutinib versus imatinib in the phase 3 BELA trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2014; 89: 947-953.
20. Gambacorti-Passerini C, Brummendorf TH, Kim DW et al. Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24-month follow-up. *Am J Hematol* 2014; 89: 732-742.
21. Campone M, Bondarenko I, Brinca S et al. Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Ann Oncol* 2012; 23: 610-617.
22. Shaw AT, Kim DW, Mehra R et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370: 1189-1197.
23. Rothenstein JM, Letarte N. Managing treatment-related adverse events associated with Alk inhibitors. *Curr Oncol* 2014; 21: 19-26.
24. Cao Y, Xiao G, Qiu X et al. Efficacy and safety of crizotinib among Chinese EML4-ALK-positive, advanced-stage non-small cell lung cancer patients. *PLoS One* 2014; 9: e114008.
25. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2385-2394.
26. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-1703.
27. Sato Y, Fujimoto D, Shibata Y et al. Fulminant hepatitis following crizotinib administration for ALK-positive non-small-cell lung carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44: 872-875.

28. Ripault MP, Pinzani V, Fayolle V et al. Crizotinib-induced acute hepatitis: first case with relapse after reintroduction with reduced dose. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37: e21-23.
29. Spreafico A, Chi KN, Sridhar SS et al. A randomized phase II study of cediranib alone versus cediranib in combination with dasatinib in docetaxel resistant, castration resistant prostate cancer patients. *Invest New Drugs* 2014; 32: 1005-1016.
30. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* 2012; 119: 1123-1129.
31. Herold CI, Chadaram V, Peterson BL et al. Phase II trial of dasatinib in patients with metastatic breast cancer using real-time pharmacodynamic tissue biomarkers of Src inhibition to escalate dosing. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6061-6070.
32. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D et al. First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010; 116: 2070-2077.
33. Haura EB, Tanvetyanon T, Chiappori A et al. Phase I/II study of the Src inhibitor dasatinib in combination with erlotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1387-1394.
34. Yoshioka H, Azuma K, Yamamoto N et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of erlotinib with or without a c-Met inhibitor tivantinib (ARQ 197) in Asian patients with previously treated stage IIIB/IV nonsquamous nonsmall-cell lung cancer harboring wild-type epidermal growth factor receptor (ATTENTION study). *Ann Oncol* 2015; 26: 2066-2072.

35. Reckamp KL, Koczywas M, Cristea MC et al. Randomized phase 2 trial of erlotinib in combination with high-dose celecoxib or placebo in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2015; 121: 3298-3306.
36. Seto T, Kato T, Nishio M et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1236-1244.
37. Renouf DJ, Tang PA, Hedley D et al. A phase II study of erlotinib in gemcitabine refractory advanced pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2014; 50: 1909-1915.
38. Moran T, Felip E, Keedy V et al. Activity of dalotuzumab, a selective anti-IGF1R antibody, in combination with erlotinib in unselected patients with Non-small-cell lung cancer: a phase I/II randomized trial. *Exp Hematol Oncol* 2014; 3: 26.
39. El-Khoueiry AB, Rankin C, Siegel AB et al. S0941: a phase 2 SWOG study of sorafenib and erlotinib in patients with advanced gallbladder carcinoma or cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2014; 110: 882-887.
40. Wu YL, Zhou C, Cheng Y et al. Erlotinib as second-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer and asymptomatic brain metastases: a phase II study (CTONG-0803). *Ann Oncol* 2013; 24: 993-999.
41. Minami S, Kijima T, Hamaguchi M et al. Phase II study of pemetrexed plus intermittent erlotinib combination therapy for pretreated advanced non-squamous non-small cell lung cancer with documentation of epidermal growth factor receptor mutation status. *Lung Cancer* 2013; 82: 271-275.
42. Goto K, Nishio M, Yamamoto N et al. A prospective, phase II, open-label study (JO22903) of first-line erlotinib in Japanese patients with epidermal growth factor receptor

(EGFR) mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2013; 82: 109-114.

43. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239-246.

44. Kobayashi T, Koizumi T, Agatsuma T et al. A phase II trial of erlotinib in patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69: 1241-1246.

45. Gridelli C, Ciardiello F, Gallo C et al. First-line erlotinib followed by second-line cisplatin-gemcitabine chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the TORCH randomized trial. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3002-3011.

46. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6657-6663.

47. Yoshimura N, Kudoh S, Mitsuoka S et al. Phase II study of a combination regimen of gefitinib and pemetrexed as first-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring a sensitive EGFR mutation. *Lung Cancer* 2015; 90: 65-70.

48. Dutton SJ, Ferry DR, Blazeby JM et al. Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG): a phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 894-904.

49. Bersanelli M, Buti S, Camisa R et al. Gefitinib plus interleukin-2 in advanced non-small cell lung cancer patients previously treated with chemotherapy. *Cancers (Basel)* 2014; 6: 2035-2048.

50. Perez CA, Song H, Raez LE et al. Phase II study of gefitinib adaptive dose escalation to skin toxicity in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2012; 48: 887-892.
51. Carlson RW, O'Neill A, Vidaurre T et al. A randomized trial of combination anastrozole plus gefitinib and of combination fulvestrant plus gefitinib in the treatment of postmenopausal women with hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 1049-1056.
52. Giaccone G, Gonzalez-Larriba JL, van Oosterom AT et al. Combination therapy with gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gemcitabine and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2004; 15: 831-838.
53. Blay JY, Shen L, Kang YK et al. Nilotinib versus imatinib as first-line therapy for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumours (ENESTg1): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 550-560.
54. Matti BF, Alwan AF, Alwan AF. Evaluation of the safety of imatinib mesylate in 200 iraqi patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase: single-center study. *Turk J Haematol* 2013; 30: 387-393.
55. Azim HA, Jr., Agbor-Tarh D, Bradbury I et al. Pattern of rash, diarrhea, and hepatic toxicities secondary to lapatinib and their association with age and response to neoadjuvant therapy: analysis from the NeoALTTO trial. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4504-4511.
56. Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A et al. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1989-1995.
57. Cho JH, Kim KM, Kwon M et al. Nilotinib in patients with metastatic melanoma harboring KIT gene aberration. *Invest New Drugs* 2012; 30: 2008-2014.

58. Kawai A, Araki N, Hiraga H et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase III study of pazopanib in patients with soft tissue sarcoma: results from the Japanese subgroup. *Jpn J Clin Oncol* 2016; 46: 248-253.
59. Xie M, He CS, Huang JK, Lin QZ. Phase II study of pazopanib as second-line treatment after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: a Southern China Urology Cancer Consortium Trial. *Eur J Cancer* 2015; 51: 595-603.
60. Tan AR, Johannes H, Rastogi P et al. Weekly paclitaxel and concurrent pazopanib following doxorubicin and cyclophosphamide as neoadjuvant therapy for HER-negative locally advanced breast cancer: NSABP Foundation FB-6, a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 149: 163-169.
61. Rini BI, Plimack ER, Takagi T et al. A Phase II Study of Pazopanib in Patients with Localized Renal Cell Carcinoma to Optimize Preservation of Renal Parenchyma. *J Urol* 2015; 194: 297-303.
62. Pignata S, Lorusso D, Scambia G et al. Pazopanib plus weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel alone for platinum-resistant or platinum-refractory advanced ovarian cancer (MITO 11): a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 561-568.
63. Phan AT, Halperin DM, Chan JA et al. Pazopanib and depot octreotide in advanced, well-differentiated neuroendocrine tumours: a multicentre, single-group, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 695-703.
64. Rautiola J, Utriainen T, Peltola K et al. Pazopanib after sunitinib failure in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol* 2014; 53: 113-118.
65. Scagliotti GV, Felip E, Besse B et al. An open-label, multicenter, randomized, phase II study of pazopanib in combination with pemetrexed in first-line treatment of patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 1529-1537.

66. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2013; 369: 722-731.
67. Cristofanilli M, Johnston SR, Manikhas A et al. A randomized phase II study of lapatinib + pazopanib versus lapatinib in patients with HER2+ inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137: 471-482.
68. Ward JE, Karrison T, Chatta G et al. A randomized, phase II study of pazopanib in castrate-sensitive prostate cancer: a University of Chicago Phase II Consortium/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium study. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012; 15: 87-92.
69. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 379: 1879-1886.
70. Necchi A, Mariani L, Zaffaroni N et al. Pazopanib in advanced and platinum-resistant urothelial cancer: an open-label, single group, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 810-816.
71. Taylor SK, Chia S, Dent S et al. A phase II study of pazopanib in patients with recurrent or metastatic invasive breast carcinoma: a trial of the Princess Margaret Hospital phase II consortium. *Oncologist* 2010; 15: 810-818.
72. Monk BJ, Mas Lopez L, Zarba JJ et al. Phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy compared with pazopanib plus lapatinib combination therapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3562-3569.
73. Hutson TE, Davis ID, Machiels JP et al. Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 475-480.
74. Friedlander M, Hancock KC, Rischin D et al. A Phase II, open-label study evaluating pazopanib in patients with recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 32-37.

75. Bible KC, Suman VJ, Molina JR et al. Efficacy of pazopanib in progressive, radioiodine-refractory, metastatic differentiated thyroid cancers: results of a phase 2 consortium study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 962-972.
76. Sleijfer S, Ray-Coquard I, Papai Z et al. Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043). *J Clin Oncol* 2009; 27: 3126-3132.
77. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013; 369: 1783-1796.
78. Zanwar S, Ostwal V, Gupta S et al. Toxicity and early outcomes of regorafenib in multiply pre-treated metastatic colorectal adenocarcinoma-experience from a tertiary cancer centre in India. *Ann Transl Med* 2016; 4: 74.
79. Yoshino T, Komatsu Y, Yamada Y et al. Randomized phase III trial of regorafenib in metastatic colorectal cancer: analysis of the CORRECT Japanese and non-Japanese subpopulations. *Invest New Drugs* 2015; 33: 740-750.
80. Li J, Qin S, Xu R et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 619-629.
81. Kim ST, Kim TW, Kim KP et al. Regorafenib as Salvage Treatment in Korean Patients with Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat* 2015; 47: 790-795.
82. Schultheis B, Folprecht G, Kuhlmann J et al. Regorafenib in combination with FOLFOX or FOLFIRI as first- or second-line treatment of colorectal cancer: results of a multicenter, phase Ib study. *Ann Oncol* 2013; 24: 1560-1567.

83. Lalami Y, Garcia C, Flamen P et al. Phase II trial evaluating the efficacy of sorafenib (BAY 43-9006) and correlating early fluorodeoxyglucose positron emission tomography-CT response to outcome in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Head Neck* 2016; 38: 347-354.
84. Srkalovic G, Hussein MA, Hoering A et al. A phase II trial of BAY 43-9006 (sorafenib) (NSC-724772) in patients with relapsing and resistant multiple myeloma: SWOG S0434. *Cancer Med* 2014; 3: 1275-1283.
85. Rollig C, Serve H, Huttmann A et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 1691-1699.
86. Lim SM, Cho BC, Kim SW et al. A multicenter phase II study of sorafenib in combination with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (KCSG-0806). *Lung Cancer* 2016; 93: 1-8.
87. Worden F, Fassnacht M, Shi Y et al. Safety and tolerability of sorafenib in patients with radioiodine-refractory thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22: 877-887.
88. Beardsley EK, Hotte SJ, North S et al. A phase II study of sorafenib in combination with bicalutamide in patients with chemotherapy-naïve castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1652-1659.
89. Martin-Richard M, Gallego R, Pericay C et al. Multicenter phase II study of oxaliplatin and sorafenib in advanced gastric adenocarcinoma after failure of cisplatin and fluoropyrimidine treatment. A GEMCAD study. *Invest New Drugs* 2013; 31: 1573-1579.
90. Lee JK, Capanu M, O'Reilly EM et al. A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2013; 109: 915-919.

91. Erhardt A, Kolligs F, Dollinger M et al. TACE plus sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the multicenter, phase II SOCRATES trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 74: 947-954.
92. Chow PK, Poon DY, Khin MW et al. Multicenter phase II study of sequential radioembolization-sorafenib therapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e90909.
93. Cheng AL, Thongprasert S, Lim HY et al. Randomized, open-label phase 2 study comparing frontline dovitinib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2016; 64: 774-784.
94. Bruix J, Takayama T, Mazzaferro V et al. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 1344-1354.
95. Lencioni R, Llovet JM, Han G et al. Sorafenib or placebo plus TACE with doxorubicin-eluting beads for intermediate stage HCC: The SPACE trial. *J Hepatol* 2016; 64: 1090-1098.
96. Kaley TJ, Wen P, Schiff D et al. Phase II trial of sunitinib for recurrent and progressive atypical and anaplastic meningioma. *Neuro Oncol* 2015; 17: 116-121.
97. Thomas A, Rajan A, Berman A et al. Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: an open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 177-186.
98. Mochler M, Gefner-Tuma I, Maderer A et al. Sunitinib added to FOLFIRI versus FOLFIRI in patients with chemorefractory advanced adenocarcinoma of the stomach or lower esophagus: a randomized, placebo-controlled phase II AIO trial with serum biomarker program. *BMC Cancer* 2016; 16: 699.
99. Cheng AL, Kang YK, Lin DY et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4067-4075.

100. Barone C, Basso M, Biolato M et al. A phase II study of sunitinib in advanced hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2013; 45: 692-698.
101. Motzer RJ, Hutson TE, McCann L et al. Overall survival in renal-cell carcinoma with pazopanib versus sunitinib. *N Engl J Med* 2014; 370: 1769-1770.
102. Armstrong AJ, Halabi S, Eisen T et al. Everolimus versus sunitinib for patients with metastatic non-clear cell renal cell carcinoma (ASPEN): a multicentre, open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 378-388.
103. Lee SJ, Lee J, Lee J et al. Phase II trial of capecitabine and everolimus (RAD001) combination in refractory gastric cancer patients. *Invest New Drugs* 2013; 31: 1580-1586.
104. Slomovitz BM, Jiang Y, Yates MS et al. Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 930-936.
105. Massarweh S, Romond E, Black EP et al. A phase II study of combined fulvestrant and everolimus in patients with metastatic estrogen receptor (ER)-positive breast cancer after aromatase inhibitor (AI) failure. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 143: 325-332.
106. Yoo C, Cho H, Song MJ et al. Efficacy and safety of everolimus and sunitinib in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017; 79: 139-146.
107. Kordes S, Klumpen HJ, Weterman MJ et al. Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 75: 1135-1141.
108. Andre F, O'Regan R, Ozguroglu M et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 580-591.
109. Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z et al. Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer

(BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 816-829.

110. Choueiri TK, Escudier B, Powles T et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 917-927.

111. Kruczek K, Ratterman M, Tolzien K et al. A phase II study evaluating the toxicity and efficacy of single-agent temsirolimus in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer* 2013; 109: 1711-1716.

112. Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A et al. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 440-444.

113. Hobday TJ, Qin R, Reidy-Lagunes D et al. Multicenter Phase II Trial of Temsirolimus and Bevacizumab in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1551-1556.

114. Emons G, Kurzeder C, Schmalfeldt B et al. Temsirolimus in women with platinum-refractory/resistant ovarian cancer or advanced/recurrent endometrial carcinoma. A phase II study of the AGO-study group (AGO-GYN8). *Gynecol Oncol* 2016; 140: 450-456.

115. Soria JC, Felip E, Cobo M et al. Afatinib versus erlotinib as second-line treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung (LUX-Lung 8): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 897-907.

116. Ding PN, Lord SJ, GebSKI V et al. Risk of Treatment-Related Toxicities from EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: A Meta-analysis of Clinical Trials of Gefitinib, Erlotinib, and Afatinib in Advanced EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 633-643.

117. Hida T, Nokihara H, Kondo M et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 29-39.
118. Larkins E, Blumenthal GM, Chen H et al. FDA Approval: Alectinib for the Treatment of Metastatic, ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Following Crizotinib. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 5171-5176.
119. Choueiri TK, Escudier B, Powles T et al. Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373: 1814-1823.
120. Drilon A, Rekhtman N, Arcila M et al. Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1653-1660.
121. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 1867-1876.
122. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1248-1260.
123. Arance AM, Berrocal A, Lopez-Martin JA et al. Safety of vemurafenib in patients with BRAF (V600) mutated metastatic melanoma: the Spanish experience. *Clin Transl Oncol* 2016; 18: 1147-1157.
124. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Drug Hepatotoxicity: Newer Agents. *Clin Liver Dis* 2017; 21: 115-134.
125. Zhu VW, Lu Y, Ou SI. Severe Acute Hepatitis in a Patient Receiving Alectinib for ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: Histologic Analysis. *Clin Lung Cancer* 2019; 20: e77-e80.

126. Nandikolla AG, Derman O, Nautsch D et al. Ibrutinib-induced severe liver injury. *Clin Case Rep* 2017; 5: 735-738.
127. Kahn A, Horsley-Silva JL, Lam-Himlin DM et al. Ibrutinib-induced acute liver failure. *Leuk Lymphoma* 2018; 59: 512-514.
128. Yoshida H, Kim YH. Successful Osimertinib Rechallenge after Severe Osimertinib-Induced Hepatotoxicity. *J Thorac Oncol* 2017; 12: e61-e63.
129. Gonzalez I, Chatterjee D. Histopathological Features of Drug-Induced Liver Injury Secondary to Osimertinib. *ACG Case Rep J* 2019; 6: e00011.
130. Hirabayashi R, Fujimoto D, Satsuma Y et al. Successful oral desensitization with osimertinib following osimertinib-induced fever and hepatotoxicity: a case report. *Invest New Drugs* 2018; 36: 952-954.
131. Ribas A, Hodi FS, Callahan M et al. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 2013; 368: 1365-1366.
132. Liu W, Makrauer FL, Qamar AA et al. Fulminant hepatic failure secondary to erlotinib. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 917-920.
133. Ueda H, Hayashi H, Kudo K et al. Successful treatment with afatinib after gefitinib- and erlotinib-induced hepatotoxicity. *Invest New Drugs* 2016; 34: 797-799.
134. Ho C, Davis J, Anderson F et al. Side effects related to cancer treatment: CASE 1. Hepatitis following treatment with gefitinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8531-8533.
135. Rocca P, El Jastimi S, Troncy J et al. [Imatinib mesylate-induced acute cytolytic hepatitis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 918-919.
136. Ohyashiki K, Kuriyama Y, Nakajima A et al. Imatinib mesylate-induced hepato-toxicity in chronic myeloid leukemia demonstrated focal necrosis resembling acute viral hepatitis. *Leukemia* 2002; 16: 2160-2161.

137. Tonyali O, Coskun U, Yildiz R et al. Imatinib mesylate-induced acute liver failure in a patient with gastrointestinal stromal tumors. *Med Oncol* 2010; 27: 768-773.
138. Ferrero D, Pogliani EM, Rege-Cambrin G et al. Corticosteroids can reverse severe imatinib-induced hepatotoxicity. *Haematologica* 2006; 91: ECR27.
139. Pariente A, Etcharry F, Cales V et al. Imatinib mesylate-induced acute hepatitis in a patient treated for gastrointestinal stromal tumour. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 785-787.
140. Kikuchi S, Muroi K, Takahashi S et al. Severe hepatitis and complete molecular response caused by imatinib mesylate: possible association of its serum concentration with clinical outcomes. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2349-2351.
141. Kong JH, Yoo SH, Lee KE et al. Early imatinib-mesylate-induced hepatotoxicity in chronic myelogenous leukaemia. *Acta Haematol* 2007; 118: 205-208.
142. Charier F, Chagneau-Derode C, Levillain P et al. [Glivec induced autoimmune hepatitis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 982-984.
143. Ayoub WS, Geller SA, Tran T et al. Imatinib (Gleevec)-induced hepatotoxicity. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 75-77.
144. Al Sobhi E, Zahrani Z, Zevallos E, Zuraiki A. Imatinib-induced immune hepatitis: case report and literature review. *Hematology* 2007; 12: 49-53.
145. Mindikoglu AL, Regev A, Bejarano PA et al. Imatinib mesylate (gleevec) hepatotoxicity. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 598-601.
146. Harbaum L, Marx A, Goekkurt E et al. Treatment with dasatinib for chronic myeloid leukemia following imatinib-induced hepatotoxicity. *Int J Hematol* 2014; 99: 91-94.
147. Peroukides S, Makatsoris T, Koutras A et al. Lapatinib-induced hepatitis: a case report. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2349-2352.

148. Klempner SJ, Choueiri TK, Yee E et al. Severe pazopanib-induced hepatotoxicity: clinical and histologic course in two patients. *J Clin Oncol* 2012; 30: e264-268.
149. Spengler EK, Kleiner DE, Fontana RJ. Vemurafenib-induced granulomatous hepatitis. *Hepatology* 2017; 65: 745-748.
150. Bechade D, Desjardin M, Castain C et al. Fatal Acute Liver Failure as a Consequence of Regorafenib Treatment in a Metastatic Colon Cancer. *Case Rep Oncol* 2017; 10: 790-794.
151. Kuwayama M, Uchino K, Takayoshi K et al. Immunosuppressant therapy successfully improved regorafenib-induced severe hepatic injury in a patient with metastatic gastrointestinal stromal tumor: A case report. *Oncol Lett* 2016; 11: 85-88.
152. Sacre A, Lanthier N, Dano H et al. Regorafenib induced severe toxic hepatitis: characterization and discussion. *Liver Int* 2016; 36: 1590-1594.
153. Fairfax BP, Pratap S, Roberts IS et al. Fatal case of sorafenib-associated idiosyncratic hepatotoxicity in the adjuvant treatment of a patient with renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12: 590.
154. Murad W, Rabinowitz I, Lee FC. Sorafenib-Induced Grade Four Hepatotoxicity in a Patient with Recurrent Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): A Case Report and Review of Literature. *ACG Case Rep J* 2014; 1: 115-117.
155. Kuroda D, Hayashi H, Nitta H et al. Successful treatment for sorafenib-induced liver dysfunction: a report of case with liver biopsy. *Surg Case Rep* 2016; 2: 4.
156. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 950-966; quiz 967.
157. Shimada S, Fukushima S, Niimori D et al. Dabrafenib and trametinib combination therapy safely performed in a patient with metastatic melanoma after severe liver toxicity due to vemurafenib. *J Dermatol* 2018; 45: e157-e158.

158. Seidel C, Fenner M, Langer F et al. Imatinib-induced liver cirrhosis in a patient with advanced gastrointestinal stroma tumor (GIST). *BMC Cancer* 2012; 12: 186.
159. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005; 129: 512-521.
160. Schlumberger M, Jarzab B, Cabanillas ME et al. A Phase II Trial of the Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor Lenvatinib (E7080) in Advanced Medullary Thyroid Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 44-53.
161. Kudo M, Finn RS, Qin S et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2018; 391: 1163-1173.
162. Votrient (pazopanib) tablets prescribing information GlaxoSmithKline. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/022465lbl.pdf.
163. Teo YL, Ho HK, Chan A. Formation of reactive metabolites and management of tyrosine kinase inhibitor-induced hepatotoxicity: a literature review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015; 11: 231-242.
164. Takimoto T, Kijima T, Otani Y et al. Polymorphisms of CYP2D6 gene and gefitinib-induced hepatotoxicity. *Clin Lung Cancer* 2013; 14: 502-507.
165. Parham LR, Briley LP, Li L et al. Comprehensive genome-wide evaluation of lapatinib-induced liver injury yields a single genetic signal centered on known risk allele HLA-DRB1*07:01. *Pharmacogenomics J* 2016; 16: 180-185.
166. Spraggs CF, Budde LR, Briley LP et al. HLA-DQA1*02:01 is a major risk factor for lapatinib-induced hepatotoxicity in women with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 667-673.

167. Xu CF, Johnson T, Wang X et al. HLA-B*57:01 Confers Susceptibility to Pazopanib-Associated Liver Injury in Patients with Cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1371-1377.
168. Chen X, Yang S, Pan Y et al. Mitochondrial pathway-mediated apoptosis is associated with erlotinib-induced cytotoxicity in hepatic cells. *Oncol Lett* 2018; 15: 783-788.
169. Weng Z, Luo Y, Yang X et al. Regorafenib impairs mitochondrial functions, activates AMP-activated protein kinase, induces autophagy, and causes rat hepatocyte necrosis. *Toxicology* 2015; 327: 10-21.
170. Paech F, Bouitbir J, Krahenbuhl S. Hepatocellular Toxicity Associated with Tyrosine Kinase Inhibitors: Mitochondrial Damage and Inhibition of Glycolysis. *Front Pharmacol* 2017; 8: 367.
171. Porceddu M, Buron N, Roussel C et al. Prediction of liver injury induced by chemicals in human with a multiparametric assay on isolated mouse liver mitochondria. *Toxicol Sci* 2012; 129: 332-345.
172. Zhang J, Salminen A, Yang X et al. Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria. *Arch Toxicol* 2017; 91: 2921-2938.
173. Cho S, Yee J, Kim JY et al. Effects of Concomitant Medication Use on Gefitinib-Induced Hepatotoxicity. *J Clin Pharmacol* 2018; 58: 263-268.
174. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-127.
175. Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2009; 69: 223-240.
176. Miners JO, Chau N, Rowland A et al. Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes by lapatinib, pazopanib, regorafenib and sorafenib: Implications for hyperbilirubinemia. *Biochem Pharmacol* 2017; 129: 85-95.

177. Long GV, Trefzer U, Davies MA et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 1087-1095.
178. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 1877-1888.
179. Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M et al. Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2016; 387: 770-778.
180. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE et al. Three-year follow-up of treatment-naive and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015; 125: 2497-2506.
181. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2071-2082.
182. Richeldi L, Costabel U, Selman M et al. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1079-1087.
183. Kim Y, Lee SJ, Lee JY et al. Clinical trial of nintedanib in patients with recurrent or metastatic salivary gland cancer of the head and neck: A multicenter phase 2 study (Korean Cancer Study Group HN14-01). *Cancer* 2017; 123: 1958-1964.
184. Goss G, Tsai CM, Shepherd FA et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1643-1652.
185. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 629-640.

186. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 2013; 31: 482-489.
187. Davies MA, Saiag P, Robert C et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600)-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 863-873.
188. Shroff RT, Yarchoan M, O'Connor A et al. The oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor pazopanib in combination with the MEK inhibitor trametinib in advanced cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2017; 116: 1402-1407.
189. Deshpande HA, Sheth K, Sosa JA, Roman S. Efficacy and tolerability of pharmacotherapy options for the treatment of medullary thyroid cancer. *Clin Med Insights Oncol* 2012; 6: 355-362.
190. van Geel RM, Hendriks JJ, Vahl JE et al. Crizotinib-induced fatal fulminant liver failure. *Lung Cancer* 2016; 93: 17-19.
191. Sassier M, Mennecier B, Gschwend A et al. Successful treatment with ceritinib after crizotinib induced hepatitis. *Lung Cancer* 2016; 95: 15-16.
192. Ramanarayanan J, Scarpace SL. Acute drug induced hepatitis due to erlotinib. *JOP* 2007; 8: 39-43.
193. Saif MW. Erlotinib-induced acute hepatitis in a patient with pancreatic cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6: 191-199.
194. Huang YS, An SJ, Chen ZH, Wu YL. Three cases of severe hepatic impairment caused by erlotinib. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68: 464-467.
195. Arora AK. Erlotinib-induced Hepatotoxicity-Clinical Presentation and Successful Management: A Case Report. *J Clin Exp Hepatol* 2011; 1: 38-40.

196. Kunimasa K, Yoshioka H, Iwasaku M et al. Successful treatment of non-small cell lung cancer with gefitinib after severe erlotinib-related hepatotoxicity. *Intern Med* 2012; 51: 431-434.
197. Nakatomi K, Nakamura Y, Tetsuya I, Kohno S. Treatment with gefitinib after erlotinib-induced liver injury: a case report. *J Med Case Rep* 2011; 5: 593.
198. Schacher-Kaufmann S, Pless M. Acute Fatal Liver Toxicity under Erlotinib. *Case Rep Oncol* 2010; 3: 182-188.
199. Toba H, Sakiyama S, Takizawa H, Tangoku A. Safe and successful treatment with afatinib in three postoperative non-small cell lung cancer patients with recurrences following gefitinib/erlotinib-induced hepatotoxicity. *J Med Invest* 2016; 63: 149-151.
200. Pellegrinotti M, Fimognari FL, Franco A et al. Erlotinib-induced hepatitis complicated by fatal lactic acidosis in an elderly man with lung cancer. *Ann Pharmacother* 2009; 43: 542-545.
201. Zenke Y, Umemura S, Sugiyama E et al. Successful treatment with afatinib after grade 3 hepatotoxicity induced by both gefitinib and erlotinib in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2016; 99: 1-3.
202. Durand M, Logerot S, Fonrose X, Schir E. [Treatment with erlotinib after gefitinib induced hepatotoxicity: literature review and case report]. *Therapie* 2014; 69: 163-168.
203. Kijima T, Shimizu T, Nonen S et al. Safe and successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced hepatotoxicity: difference in metabolism as a possible mechanism. *J Clin Oncol* 2011; 29: e588-590.
204. Takeda M, Okamoto I, Fukuoka M, Nakagawa K. Successful treatment with erlotinib after gefitinib-related severe hepatotoxicity. *J Clin Oncol* 2010; 28: e273-274.

205. Yano Y, Namba Y, Mori M et al. Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib following Gefitinib-Induced Hepatotoxicity: Review of 8 Clinical Cases. *Lung Cancer Int* 2012; 2012: 354657.
206. Chen X, Pan Y, Zhang S et al. Rechallenge with gefitinib following severe drug-induced hepatotoxicity in a patient with advanced non-small cell lung cancer: A case report and literature review. *Oncol Lett* 2014; 7: 878-880.
207. Carlini P, Papaldo P, Fabi A et al. Liver toxicity after treatment with gefitinib and anastrozole: drug-drug interactions through cytochrome p450? *J Clin Oncol* 2006; 24: e60-61.
208. Yonesaka K, Suzumura T, Tsukuda H et al. Erlotinib is a well-tolerated alternate treatment for non-small cell lung cancer in cases of gefitinib-induced hepatotoxicity. *Anticancer Res* 2014; 34: 5211-5215.
209. Bonvin A, Mesnil A, Nicolini FE et al. Dasatinib-induced acute hepatitis. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 1630-1632.
210. James C, Trouette H, Marit G et al. Histological features of acute hepatitis after imatinib mesylate treatment. *Leukemia* 2003; 17: 978-979.
211. Cross TJ, Bagot C, Portmann B et al. Imatinib mesylate as a cause of acute liver failure. *Am J Hematol* 2006; 81: 189-192.
212. Thia TJ, Tan HH, Chuah TH et al. Imatinib mesylate-related fatal acute hepatic failure in a patient with chronic myeloid leukaemia and chronic hepatitis B infection. *Singapore Med J* 2008; 49: e86-89.
213. Perini GF, Santos FP, Funke V et al. Nilotinib post-liver transplantation for acute hepatic failure related to imatinib. *Leuk Res* 2009; 33: e234-235.
214. Suzuki R, Kobayashi C, Sakai A et al. Imatinib-induced Severe Hepatitis in a 9-Year-old Girl With Philadelphia Chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37: e368-371.

215. Dhalluin-Venier V, Besson C, Dimet S et al. Imatinib mesylate-induced acute hepatitis with autoimmune features. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1235-1237.
216. Fuster F, Medina L, Vallansot R et al. [Imatinib-induced toxic hepatitis: description of two cases and review of the literature]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 525-530.
217. Aliberti S, Grignani G, Allione P et al. An acute hepatitis resembling autoimmune hepatitis occurring during imatinib therapy in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Am J Clin Oncol* 2009; 32: 640-641.
218. Ridruejo E, Cacchione R, Villamil AG et al. Imatinib-induced fatal acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6608-6111.
219. Gupta S, Bhatt VR, Varma S. Recurrent imatinib-induced hepatotoxicity in a chronic myeloid leukaemia patient successfully managed with prednisone. *BMJ Case Rep* 2011; 2011.
220. Raissouni S, Quraishi Z, Al-Ghamdi M et al. Acute liver failure and seizures as a consequence of regorafenib exposure in advanced rectal cancer. *BMC Res Notes* 2015; 8: 538.
221. Mancuso A, Zavaglia C, Bai F et al. Letter: Sorafenib hepatotoxicity may be enhanced during treatment of advanced hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 1414-1416.
222. Taran A, Ignatov A, Smith B et al. Acute hepatic failure following monotherapy with sunitinib for ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63: 971-972.
223. Weise AM, Liu CY, Shields AF. Fatal liver failure in a patient on acetaminophen treated with sunitinib malate and levothyroxine. *Ann Pharmacother* 2009; 43: 761-766.
224. Mermershtain W, Lazarev I, Shani-Shrem N, Ariad S. Fatal liver failure in a patient treated with sunitinib for renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2013; 11: 70-72.
225. Nolan CM, Goldberg SV, Buskin SE. Hepatotoxicity associated with isoniazid preventive therapy: a 7-year survey from a public health tuberculosis clinic. *Jama* 1999; 281: 1014-1018.

226. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ et al. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *Jama* 1994; 271: 992-998.
227. Perlemuter G, Cacoub P, Valla D et al. Characterisation of Agomelatine-Induced Increase in Liver Enzymes: Frequency and Risk Factors Determined from a Pooled Analysis of 7605 Treated Patients. *CNS Drugs* 2016; 30: 877-888.
228. Wan YJ, Morimoto M, Thurman RG et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is decreased in experimental alcoholic liver disease. *Life Sci* 1995; 56: 307-317.
229. 4. NCICTCfAECv. Available at: <https://evs-nci-nih.gov.gate2.inist.fr/ftp1/CTCAE/About.html>.
230. Fontana RJ, Watkins PB, Bonkovsky HL et al. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) prospective study: rationale, design and conduct. *Drug Saf* 2009; 32: 55-68.
231. Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2011; 141: 1665-1672 e1661-1669.
232. Hu J, Zhang Q, Ren X et al. Efficacy and safety of acetylcysteine in "non-acetaminophen" acute liver failure: A meta-analysis of prospective clinical trials. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; 39: 594-599.
233. Olin JL, Woods JA, Garner SJ. Delayed Presentation of Hepatocellular Liver Injury After Nintedanib Administration. *Am J Ther* 2017; 24: e107-e108.
234. Ikeda S, Sekine A, Baba T et al. Low body surface area predicts hepatotoxicity of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 2017; 7: 10811.

Table 1. Hepatotoxicity of MKI agents in clinical trials.

Drug	Incidence of LFT abnormalities - all grades (%)	Grade 3-4 LFT abnormalities (%)	Outcome	References
Afatinib	20-50	1-2		[115, 116]
Alectinib	10-50	1-4		[117, 118]
Axitinib	2-42	1-8		[10-15]
Bosutinib	14-58	4-19		[16-21]
Cabozantinib	16-97	2-8		[119, 120]
Ceritinib	25-35	11-21		[22]
Cobimetinib	24-70	6-12		[121, 122]
Crizotinib	13-40	2-16		[22-28]
Dabrafenib	11-42	0-4		[177, 178]
Dasatinib	3-16	0-9		[29-33]
Erlotinib	2-85	0-12		[34-46]
Gefitinib	6-87	1-11		[47-52]
Ibrutinib	0-14	0-3	Death reported for Lenvatinib (3 cases)	[179, 180]
Imatinib	1-35	1-3	Pazopanib (2 cases),	[19, 53, 54]
Lapatinib	26-41	8-14	Sorafenib (7 cases) and	[55, 56]
Lenvatinib	12-14	3-5	Sunitinib (9 cases).	[160, 161]
Nilotinib	0-70	4-9		[57]
Nintedanib	5-59	1-9	No informations available for the other molecules.	[181-183]
Osimertinib	4-6	1		[184, 185]
Pazopanib	8-68	1-20		[58-76]
Ponatinib	3-12	2-4		[77]
Regorafenib	7-92	5-11		[78-82]
Sorafenib	3-44	0-29		[83-95]
Sunitinib	9-67	0-8		[96-102]
Trametinib	10-44	0-5		[186-188]
Vandetanib	3-51	2-5		[7, 189]
Vemurafenib	11-38	0-6		[123, 124]
Everolimus	5-87	0-6		[102-110]
Temsirolimus	4-56	0-7		[111-114]

Abbreviations: MKI, multikinase inhibitor; LFT, liver function tests.

Table 2. Hepatotoxicity of MKI in case reports.

MKI agent	Type of hepatic lesion	Mechanism	Latency	Outcome	Liver Biopsy	Other	Risk of liver injury	References
Alectinib	Hepatocellular	Metabolic	5 month	Recovery: 1 case No death reported	Severe active hepatitis with bridging necrosis	Successful reintroduction at the same dose after LFT normalisation Hepatitis E infection not ruled out	+	[125]
Bosutinib	Hepatocellular	Immuno-allergic	Within 4 month	Recovery: 1 case No death reported	-	Hy's law cases Recovery without drug withdrawal in half of patients (clinical trials)	+	[21]
Crizotinib	Hepatocellular	Metabolic; immuno-allergic	10 days - 2 month	Recovery: 3 cases Death: 3 cases	-	Positive rechallenge: 4 cases Successful reintroduction at reduced dose in most cases (clinical trials)	+++	[24-28, 190, 191]
Dasatinib	Mixed	Metabolic	7 month	Recovery: 1 case No death reported	-	-	+	[209]
Erlotinib	Hepatocellular	Immuno-allergic	2 - 37 days	Recovery: 5 cases Death: 6 cases	Severe active hepatitis with bridging necrosis	Successful switch to Gefitinib: 2 cases Positive rechallenge: 2 cases Possible causes incompletely ruled out	+++	[132, 133, 192-201]
Gefitinib	Hepatocellular	Metabolic; immuno-allergic	22 - 392 days	Recovery: 19 cases No death reported	Hepatocyte necrosis and increased fibrosis	Successful switch to Erlotinib or Afatinib: 15 cases Positive lymphocyte stimulation test: 1 case	++	[134, 164, 173, 202-208]

Ibrutinib	Hepatocellular	Metabolic	2 – 36 weeks	Recovery: 2 cases No death reported	Centrilobular (zone 3) hepatocyte injury and mixed inflammatory cell infiltrate, canalicular cholestasis	Positive rechallenge: 6 cases -	+	[126, 127]
Imatinib	Hepatocellular; mixed	Immuno-allergic	12 - 504 days	Recovery: 22 cases Cirrhosis: 1 case LT: 2 cases Death: 2 cases	Centrilobular (zone 3) hepatocyte necrosis and inflammatory infiltrate, fibrous scars Autoimmune hepatitis-like lesions (bridging necrosis, lymphoplasmacytic infiltrate)	Positive rechallenge: 10 cases Corticotherapy allowed Imatinib reintroduction and/or LFT recovery: 11 cases Successful switch to Dasatinib: 2 case	+++	[135-146, 158, 210-219]
Lapatinib	Hepatocellular	Immuno-allergic	25 days	Recovery: 1 case No death reported	Bridging necrosis, eosinophil infiltrate	-	++	[147]
Nintedanib	Hepatocellular	Metabolic	8 month	Recovery: 1 case No death reported	-	Low body surface area is a risk factor for aminotransferase elevation during treatment Successful reintroduction at reduced dose	++	[233, 234]
Osimertinib	Hepatocellular	Immuno-allergic	15 days - 1 month	Recovery: 3 cases No death reported	Pericentral confluent necrosis	Positive rechallenge: 1 case Successful reintroduction after oral desensitization: 2 cases	++	[128-130]

						Possible causes incompletely ruled out		
Pazopanib	Hepatocellular; mixed	Immuno- allergic	14 - 28 days	Recovery: 1 case Death: 3 cases (2 cases in clinical trials)	Inflammatory infiltrate in periportal areas with eosinophilia, mild centrilobular cholestasis	-	+++	[148, 167]
Regorafenib	Hepatocellular	Metabolic; immuno- allergic	5 days - 4 months	Recovery: 4 cases Death: 2 cases	Centrilobular hepatic necrosis with confluent destruction of acinar zone 3	Possible drug-induced autoimmune hepatitis	+++	[150-152, 220]
Sorafenib	Hepatocellular; mixed	Metabolic; immuno- allergic	8 days - 2 months	Recovery: 4 cases Death: 1 case	Hepatocyte necrosis with lymphocyte infiltrate	-	+++	[153-155, 221]
Sunitinib	Hepatocellular	Metabolic	21 - 252 days	Death: 3 cases	Centrilobular necrosis	-	+++	[222-224]
Vemurafenib	Mixed	Immuno- allergic	6 weeks	Recovery: 1 case No death reported	Granulomatous inflammation and eosinophil infiltrate, centrilobular (zone 3) canalicular cholestasis	Successful switch to Dabrafenib: 1 case	+	[149]
Vemurafenib- Ipilimumab combination	Hepatocellular	Immuno- allergic	2-5 weeks	Recovery: 6 cases No death reported	-	Corticotherapy allowed LFT recovery: 5 cases Hy's law cases	+++	[131]

Abbreviations: MKI, multi-kinase inhibitor; LFT, liver function tests.

Figure 1

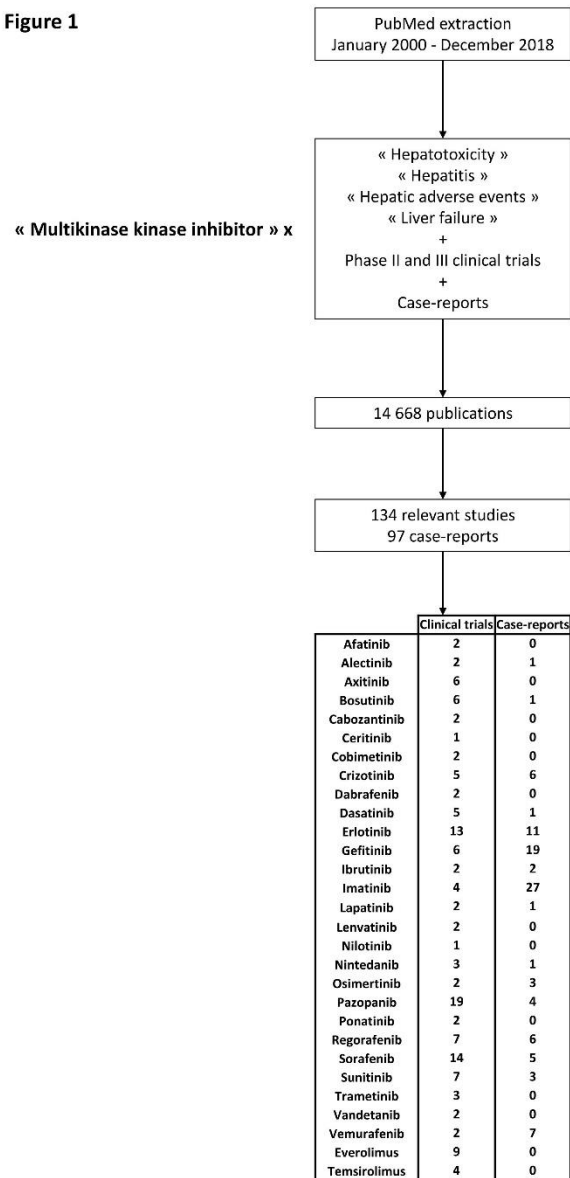


Figure 1. Results of literature search

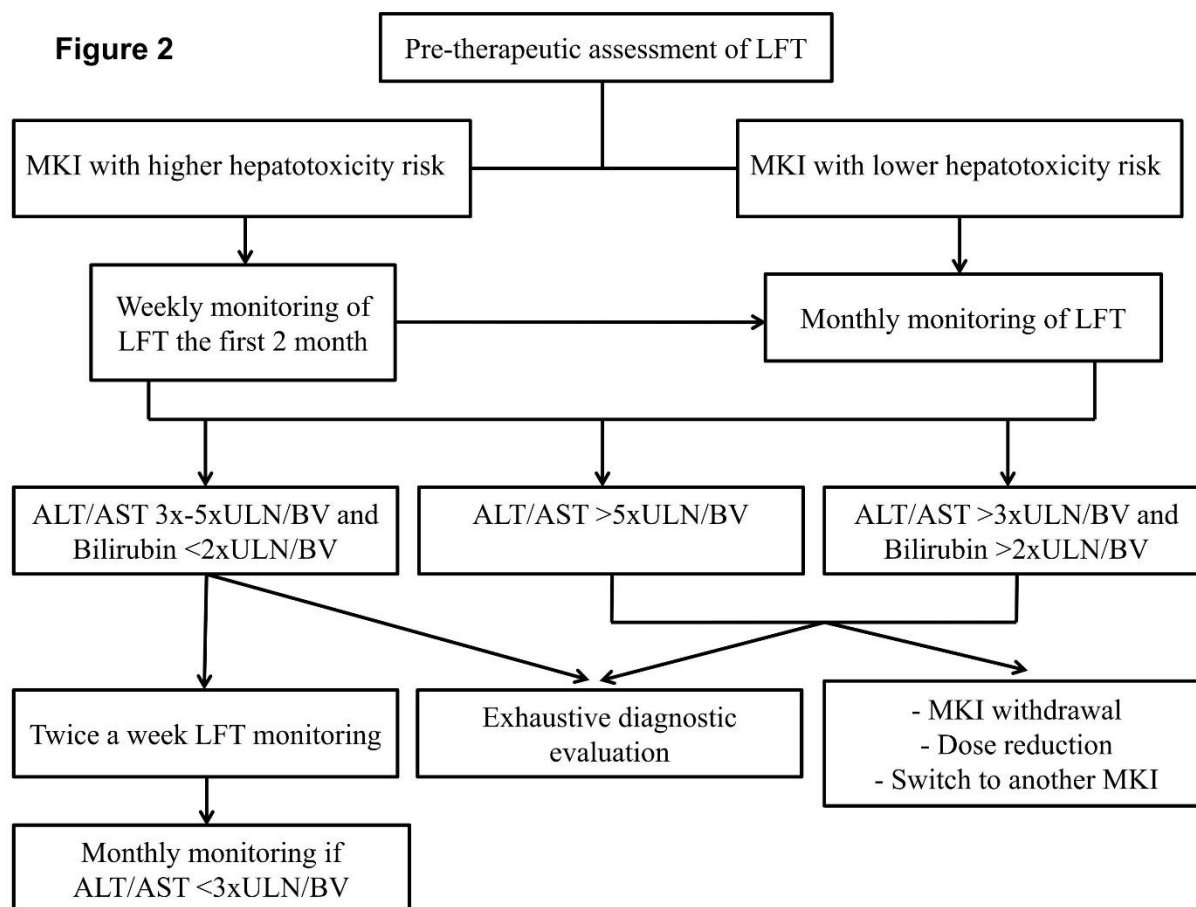


Figure 2. Management of patients with suspected MKI-induced liver toxicity.

Abbreviations: LFT, liver function tests; MKI, multi-kinase inhibitor; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ULN, upper limit of normal; BV, baseline value

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alberti, K. G.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. A.; Fruchart, J. C.; James, W. P.; Loria, C. M.; Smith, S. C.; Prevention, I. D. F. T. F. o. E. a.; National Heart, Lung, and Blood Institute; Association, A. H.; Federation, W. H.; Society, I. A.; Obesity, I. A. F. t. S. o., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **2009**, *120* (16), 1640-5.
2. Saklayen, M. G., The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* **2018**, *20* (2), 12.
3. Araújo, A. R.; Rosso, N.; Bedogni, G.; Tiribelli, C.; Bellentani, S., Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int* **2018**, *38* Suppl 1, 47-51.
4. Peverill, W.; Powell, L. W.; Skoien, R., Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (5), 8591-638.
5. Younossi, Z. M.; Loomba, R.; Anstee, Q. M.; Rinella, M. E.; Bugianesi, E.; Marchesini, G.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Serfaty, L.; Negro, F.; Caldwell, S. H.; Ratziu, V.; Corey, K. E.; Friedman, S. L.; Abdelmalek, M. F.; Harrison, S. A.; Sanyal, A. J.; Lavine, J. E.; Mathurin, P.; Charlton, M. R.; Goodman, Z. D.; Chalasani, N. P.; Kowdley, K. V.; George, J.; Lindor, K., Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology* **2018**, *68* (1), 349-360.
6. Eslam, M.; Newsome, P. N.; Sarin, S. K.; Anstee, Q. M.; Targher, G.; Romero-Gomez, M.; Zelber-Sagi, S.; Wai-Sun Wong, V.; Dufour, J. F.; Schattenberg, J. M.; Kawaguchi, T.; Arrese, M.; Valenti, L.; Shiha, G.; Tiribelli, C.; Yki-Järvinen, H.; Fan, J. G.; Grønbaek, H.; Yilmaz, Y.; Cortez-Pinto, H.; Oliveira, C. P.; Bedossa, P.; Adams, L. A.; Zheng, M. H.; Fouad, Y.; Chan, W. K.; Mendez-Sanchez, N.; Ahn, S. H.; Castera, L.; Bugianesi, E.; Ratziu, V.; George, J., A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol* **2020**.
7. Takahashi, Y.; Fukusato, T., Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (42), 15539-48.
8. Younossi, Z. M., Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol* **2019**, *70* (3), 531-544.
9. Sherif, Z. A., The Rise in the Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma, Nonalcoholic Fatty Liver Disease - An Update. Emad Hamdy Gad, IntechOpen, 2019.
10. Lawrence Serfaty. Oumarou Nabi, J. B.; Philippe Mathurin, V. D. L., Marcel Goldberg, Marie Zins, K. L., Epidemiology of NAFLD and advanced fibrosis in the French general population: A population-based cohort study in 118, 664 subjects (NASH-CO study). *Journal of hepatology*, Vol. 70, pp 309-310.
11. Pimpin, L.; Cortez-Pinto, H.; Negro, F.; Corbould, E.; Lazarus, J. V.; Webber, L.; Sheron, N.; Committee, E. H. S., Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol* **2018**, *69* (3), 718-735.
12. (NCD-RisC), N. R. F. C., Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*, 2017; Vol. 390.

13. Nobili, V.; Alisi, A.; Valenti, L.; Miele, L.; Feldstein, A. E.; Alkhoury, N., NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16* (9), 517-530.
14. Ascha, M. S.; Hanouneh, I. A.; Lopez, R.; Tamimi, T. A.; Feldstein, A. F.; Zein, N. N., The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2010**, *51* (6), 1972-8.
15. Pappachan, J. M.; Babu, S.; Krishnan, B.; Ravindran, N. C., Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol* **2017**, *5* (4), 384-393.
16. Hashimoto, E.; Taniai, M.; Tokushige, K., Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol* **2013**, *28 Suppl 4*, 64-70.
17. Lucas, C.; Lucas, G.; Lucas, N.; Krzowska-Firyeh, J.; Tomasiewicz, K., A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol* **2018**, *4* (3), 165-174.
18. 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), 305-315.
19. Loomba, R.; Seguritan, V.; Li, W.; Long, T.; Klitgord, N.; Bhatt, A.; Dulai, P. S.; Caussy, C.; Bettencourt, R.; Highlander, S. K.; Jones, M. B.; Sirlin, C. B.; Schnabl, B.; Brinkac, L.; Schork, N.; Chen, C. H.; Brenner, D. A.; Biggs, W.; Yooseph, S.; Venter, J. C.; Nelson, K. E., Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab* **2017**, *25* (5), 1054-1062.e5.
20. Zhou, Y.; Orešič, M.; Leivonen, M.; Gopalacharyulu, P.; Hyysalo, J.; Arola, J.; Verrijken, A.; Francque, S.; Van Gaal, L.; Hyötyläinen, T.; Yki-Järvinen, H., Noninvasive Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Clinical Markers and Circulating Levels of Lipids and Metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2016**, *14* (10), 1463-1472.e6.
21. Kleiner, D. E.; Brunt, E. M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M. J.; Cummings, O. W.; Ferrell, L. D.; Liu, Y. C.; Torbenson, M. S.; Unalp-Arida, A.; Yeh, M.; McCullough, A. J.; Sanyal, A. J.; Network, N. S. C. R., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2005**, *41* (6), 1313-21.
22. Bedossa, P.; Poitou, C.; Veyrie, N.; Bouillot, J. L.; Basdevant, A.; Paradis, V.; Tordjman, J.; Clement, K., Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **2012**, *56* (5), 1751-9.
23. Paik, J. M.; Golabi, P.; Younossi, Y.; Mishra, A.; Younossi, Z. M., Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2020**.
24. Sayiner, M.; Younossi, Z. M., Nonalcoholic Steatohepatitis Is Becoming a Top Indication for Liver Transplantation Worldwide. *Liver Transpl* **2019**, *25* (1), 10-11.
25. Sayiner, M.; Koenig, A.; Henry, L.; Younossi, Z. M., Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis* **2016**, *20* (2), 205-14.
26. Mundi, M. S.; Velapati, S.; Patel, J.; Kellogg, T. A.; Abu Dayyeh, B. K.; Hurt, R. T., Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutr Clin Pract* **2020**, *35* (1), 72-84.
27. Konerman, M. A.; Jones, J. C.; Harrison, S. A., Pharmacotherapy for NASH: Current and emerging. *J Hepatol* **2018**, *68* (2), 362-375.
28. Younossi, Z. M.; Marchesini, G.; Pinto-Cortez, H.; Petta, S., Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation. *Transplantation* **2019**, *103* (1), 22-27.
29. Calzadilla-Bertot, L.; Jeffrey, G. P.; Jacques, B.; McCaughan, G.; Crawford, M.; Angus, P.; Jones, R.; Gane, E.; Munn, S.; Macdonald, G.; Fawcett, J.; Wigg, A.; Chen, J.; Fink, M.; Adams, L. A., Increasing Incidence of Nonalcoholic Steatohepatitis as an Indication for Liver Transplantation in Australia and New Zealand. *Liver Transpl* **2019**, *25* (1), 25-34.
30. Kitade, H.; Chen, G.; Ni, Y.; Ota, T., Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients* **2017**, *9* (4).

31. Xu, L.; Nagata, N.; Ota, T., Impact of Glucoraphanin-Mediated Activation of Nrf2 on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with a Focus on Mitochondrial Dysfunction. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (23).
32. Kim, K. H.; Lee, M. S., Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis and Hormone-Based Therapeutic Approaches. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 485.
33. Chao, H. W.; Chao, S. W.; Lin, H.; Ku, H. C.; Cheng, C. F., Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (2).
34. Tilg, H.; Moschen, A. R.; Roden, M., NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (1), 32-42.
35. Perla, F. M.; Prelati, M.; Lavorato, M.; Visicchio, D.; Anania, C., The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)* **2017**, *4* (6).
36. Mu, W.; Cheng, X. F.; Liu, Y.; Lv, Q. Z.; Liu, G. L.; Zhang, J. G.; Li, X. Y., Potential Nexus of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus: Insulin Resistance Between Hepatic and Peripheral Tissues. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 1566.
37. Samuel, V. T.; Shulman, G. I., Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* **2018**, *27* (1), 22-41.
38. Kahn, C. R.; Wang, G.; Lee, K. Y., Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest* **2019**, *129* (10), 3990-4000.
39. Kazankov, K.; Jørgensen, S. M. D.; Thomsen, K. L.; Møller, H. J.; Vilstrup, H.; George, J.; Schuppan, D.; Grønbaek, H., The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16* (3), 145-159.
40. Bódis, K.; Roden, M., Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *Eur J Clin Invest* **2018**, *48* (11), e13017.
41. Rodríguez, A.; Ezquerro, S.; Méndez-Giménez, L.; Becerril, S.; Frühbeck, G., Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2015**, *309* (8), E691-714.
42. Petersen, M. C.; Shulman, G. I., Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38* (7), 649-665.
43. Alves-Bezerra, M.; Cohen, D. E., Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* **2017**, *8* (1), 1-8.
44. Gluchowski, N. L.; Becuwe, M.; Walther, T. C.; Farese, R. V., Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (6), 343-355.
45. M, M., Métabolismes hépatiques. J-F, B., Ed. Elsevier-Masson: Hepatologie, 2008.
46. Svegliati-Baroni, G.; Pierantonelli, I.; Torquato, P.; Marinelli, R.; Ferreri, C.; Chatgililoglu, C.; Bartolini, D.; Galli, F., Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* **2019**, *144*, 293-309.
47. Ipsen, D. H.; Lykkesfeldt, J.; Tveden-Nyborg, P., Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* **2018**, *75* (18), 3313-3327.
48. Abdul-Wahed, A.; Guilmeau, S.; Postic, C., Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab* **2017**, *26* (2), 324-341.
49. Robichon, C.; Girard, J.; Postic, C., [Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]. *Med Sci (Paris)* **2008**, *24* (10), 841-6.
50. Houten, S. M.; Violante, S.; Ventura, F. V.; Wanders, R. J., The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu Rev Physiol* **2016**, *78*, 23-44.
51. Piccinin, E.; Villani, G.; Moschetta, A., Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: the role of PGC1 coactivators. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16* (3), 160-174.
52. Jiang, Z. G.; Robson, S. C.; Yao, Z., Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biomed Res* **2013**, *27* (1), 1-13.
53. Simon, J.; Nuñez-García, M.; Fernández-Tussy, P.; Barbier-Torres, L.; Fernández-Ramos, D.; Gómez-Santos, B.; Buqué, X.; Lopitz-Otsoa, F.; Goikoetxea-Usandizaga, N.; Serrano-Macia, M.; Rodriguez-Agudo, R.; Bizkarguenaga, M.; Zubiete-Franco, I.; Gutiérrez-de Juan, V.; Cabrera, D.; Alonso, C.; Iruzubieta, P.; Romero-Gomez, M.; van Liempd, S.; Castro, A.; Nogueiras, R.; Varela-Rey, M.; Falcón-Pérez, J. M.; Villa, E.; Crespo, J.; Lu, S. C.; Mato, J. M.; Aspichueta, P.; Delgado, T.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- C.; Martínez-Chantar, M. L., Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. *Cell Metab* **2020**, *31* (3), 605-622.e10.
54. Perry, R. J.; Samuel, V. T.; Petersen, K. F.; Shulman, G. I., The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **2014**, *510* (7503), 84-91.
55. Mato, J. M.; Alonso, C.; Noureddin, M.; Lu, S. C., Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **2019**, *25* (24), 3009-3020.
56. Marra, F.; Svegliati-Baroni, G., Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol* **2018**, *68* (2), 280-295.
57. Mota, M.; Banini, B. A.; Cazanave, S. C.; Sanyal, A. J., Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **2016**, *65* (8), 1049-61.
58. Yamaguchi, K.; Yang, L.; McCall, S.; Huang, J.; Yu, X. X.; Pandey, S. K.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; Li, Y. X.; Diehl, A. M., Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2007**, *45* (6), 1366-74.
59. Alkhoury, N.; Dixon, L. J.; Feldstein, A. E., Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2009**, *3* (4), 445-51.
60. Papazyan, R.; Sun, Z.; Kim, Y. H.; Titchenell, P. M.; Hill, D. A.; Lu, W.; Damle, M.; Wan, M.; Zhang, Y.; Briggs, E. R.; Rabinowitz, J. D.; Lazar, M. A., Physiological Suppression of Lipotoxic Liver Damage by Complementary Actions of HDAC3 and SCAP/SREBP. *Cell Metab* **2016**, *24* (6), 863-874.
61. Tirosh, O., Hypoxic Signaling and Cholesterol Lipotoxicity in Fatty Liver Disease Progression. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 2548154.
62. Yu, J.; Marsh, S.; Hu, J.; Feng, W.; Wu, C., The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract* **2016**, *2016*, 2862173.
63. Doherty, D. G., Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun* **2016**, *66*, 60-75.
64. Racanelli, V.; Rehermann, B., The liver as an immunological organ. *Hepatology* **2006**, *43* (2 Suppl 1), S54-62.
65. Martinez, F. O.; Gordon, S., The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **2014**, *6*, 13.
66. Palma, A.; Jarrah, A. S.; Tieri, P.; Cesareni, G.; Castiglione, F., Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States. *Front Physiol* **2018**, *9*, 1659.
67. Hao, N. B.; Lü, M. H.; Fan, Y. H.; Cao, Y. L.; Zhang, Z. R.; Yang, S. M., Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* **2012**, *2012*, 948098.
68. Ambade, A.; Satishchandran, A.; Saha, B.; Gyongyosi, B.; Lowe, P.; Kodys, K.; Catalano, D.; Szabo, G., Hepatocellular carcinoma is accelerated by NASH involving M2 macrophage polarization mediated by hif-1. *Oncoimmunology* **2016**, *5* (10), e1221557.
69. Roh, Y. S.; Seki, E., Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* **2013**, *28* Suppl 1, 38-42.
70. Friedman, S. L.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Rinella, M.; Sanyal, A. J., Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* **2018**, *24* (7), 908-922.
71. Arrese, M.; Cabrera, D.; Kalergis, A. M.; Feldstein, A. E., Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* **2016**, *61* (5), 1294-303.
72. Lee, Y. A.; Wallace, M. C.; Friedman, S. L., Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* **2015**, *64* (5), 830-41.
73. Diehl, A. M.; Day, C., Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med* **2017**, *377* (21), 2063-2072.
74. Machado, M. V.; Diehl, A. M., Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **2016**, *150* (8), 1769-77.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

75. Macaluso, F. S.; Maida, M.; Petta, S., Genetic background in nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (39), 11088-111.
76. Zhang, X.; Yang, W.; Wang, J.; Meng, Y.; Guan, Y.; Yang, J., FAM3 gene family: A promising therapeutical target for NAFLD and type 2 diabetes. *Metabolism* **2018**, *81*, 71-82.
77. Canivet, C. M.; Bonnafous, S.; Rousseau, D.; Leclere, P. S.; Lacas-Gervais, S.; Patouraux, S.; Sans, A.; Luci, C.; Bailly-Maitre, B.; Iannelli, A.; Tran, A.; Anty, R.; Gual, P., Hepatic FNDC5 is a potential local protective factor against Non-Alcoholic Fatty Liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2020**, *1866* (5), 165705.
78. Metwally, M.; Bayoumi, A.; Romero-Gomez, M.; Thabet, K.; John, M.; Adams, L. A.; Huo, X.; Aller, R.; García-Monzón, C.; Teresa Arias-Loste, M.; Bugianesi, E.; Miele, L.; Gallego-Durán, R.; Fischer, J.; Berg, T.; Liddle, C.; Qiao, L.; George, J.; Eslam, M., A polymorphism in the Irisin-encoding gene (FNDC5) associates with hepatic steatosis by differential miRNA binding to the 3'UTR. *J Hepatol* **2019**, *70* (3), 494-500.
79. L., S., Metabolic Interplay Between White, Beige, Brown Adipocytes and the Liver. J., H., Ed. *Journal of Hepatology*, 2016; Vol. 64, pp 1176-1186.
80. Tilg, H.; Moschen, A. R., Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **2010**, *52* (5), 1836-46.
81. Paulo, E.; Wang, B., Towards a Better Understanding of Beige Adipocyte Plasticity. *Cells* **2019**, *8* (12).
82. Fedorenko, A.; Lishko, P. V.; Kirichok, Y., Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* **2012**, *151* (2), 400-13.
83. Golozoubova, V.; Cannon, B.; Nedergaard, J., UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2006**, *291* (2), E350-7.
84. Nishimoto, Y.; Tamori, Y., CIDE Family-Mediated Unique Lipid Droplet Morphology in White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue Determines the Adipocyte Energy Metabolism. *J Atheroscler Thromb* **2017**, *24* (10), 989-998.
85. Marlatt, K. L.; Ravussin, E., Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr Obes Rep* **2017**, *6* (4), 389-396.
86. van Marken Lichtenbelt, W. D.; Vanhommerig, J. W.; Smulders, N. M.; Drossaerts, J. M.; Kemerink, G. J.; Bouvy, N. D.; Schrauwen, P.; Teule, G. J., Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **2009**, *360* (15), 1500-8.
87. D.P, B., Selective Impairment of Glucose but Not Fatty Acid or Oxidative Metabolism in Brown Adipose Tissue of Subjects With Type 2 Diabetes. Sébastien M Labbé , C. N., Margaret Kunach , Serge Phoenix , Brigitte Guérin , Éric E Turcotte , François Haman , Denis Richard , André C Carpentier, Ed. *Diabetes*, 2015; Vol. 64, pp 2388 - 2397.
88. Enerbäck, S.; Jacobsson, A.; Simpson, E. M.; Guerra, C.; Yamashita, H.; Harper, M. E.; Kozak, L. P., Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **1997**, *387* (6628), 90-4.
89. Feldmann, H. M.; Golozoubova, V.; Cannon, B.; Nedergaard, J., UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* **2009**, *9* (2), 203-9.
90. Kopecky, J.; Clarke, G.; Enerbäck, S.; Spiegelman, B.; Kozak, L. P., Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest* **1995**, *96* (6), 2914-23.
91. Ghorbani, M.; Himms-Hagen, J., Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1997**, *21* (6), 465-75.
92. Ghorbani, M.; Claus, T. H.; Himms-Hagen, J., Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol* **1997**, *54* (1), 121-31.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

93. Almind, K.; Manieri, M.; Sivitz, W. I.; Cinti, S.; Kahn, C. R., Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (7), 2366-71.
94. Vitali, A.; Murano, I.; Zingaretti, M. C.; Frontini, A.; Ricquier, D.; Cinti, S., The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* **2012**, *53* (4), 619-29.
95. Bachman, E. S.; Dhillon, H.; Zhang, C. Y.; Cinti, S.; Bianco, A. C.; Kobilka, B. K.; Lowell, B. B., betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* **2002**, *297* (5582), 843-5.
96. Stanford, K. I.; Middelbeek, R. J.; Townsend, K. L.; An, D.; Nygaard, E. B.; Hitchcox, K. M.; Markan, K. R.; Nakano, K.; Hirshman, M. F.; Tseng, Y. H.; Goodyear, L. J., Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **2013**, *123* (1), 215-23.
97. Petrovic, N.; Walden, T. B.; Shabalina, I. G.; Timmons, J. A.; Cannon, B.; Nedergaard, J., Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* **2010**, *285* (10), 7153-64.
98. Wu, J.; Cohen, P.; Spiegelman, B. M., Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* **2013**, *27* (3), 234-50.
99. Kwok, K. H.; Lam, K. S.; Xu, A., Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* **2016**, *48*, e215.
100. Lee, J. H.; Park, A.; Oh, K. J.; Lee, S. C.; Kim, W. K.; Bae, K. H., The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (19).
101. Sommer, F.; Bäckhed, F., The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11* (4), 227-38.
102. Fujimura, K. E.; Slusher, N. A.; Cabana, M. D.; Lynch, S. V., Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2010**, *8* (4), 435-54.
103. Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J. M.; Kennedy, S.; Leonard, P.; Li, J.; Burgdorf, K.; Grarup, N.; Jørgensen, T.; Brandslund, I.; Nielsen, H. B.; Juncker, A. S.; Bertalan, M.; Levenez, F.; Pons, N.; Rasmussen, S.; Sunagawa, S.; Tap, J.; Tims, S.; Zoetendal, E. G.; Brunak, S.; Clément, K.; Doré, J.; Kleerebezem, M.; Kristiansen, K.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; de Vos, W. M.; Zucker, J. D.; Raes, J.; Hansen, T.; Bork, P.; Wang, J.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O.; consortium, M., Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **2013**, *500* (7464), 541-6.
104. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Fernandes, G. R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J. M.; Bertalan, M.; Borrueal, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H. B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E. G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W. M.; Brunak, S.; Doré, J.; Antolín, M.; Artiguenave, F.; Blottiere, H. M.; Almeida, M.; Brechot, C.; Cara, C.; Chervaux, C.; Cultrone, A.; Delorme, C.; Denariáz, G.; Dervyn, R.; Foerstner, K. U.; Friss, C.; van de Guchte, M.; Guedon, E.; Haimet, F.; Huber, W.; van Hylckama-Vlieg, J.; Jamet, A.; Juste, C.; Kaci, G.; Knol, J.; Lakhdari, O.; Layec, S.; Le Roux, K.; Maguin, E.; Mérieux, A.; Melo Minardi, R.; M'rini, C.; Muller, J.; Oozeer, R.; Parkhill, J.; Renault, P.; Rescigno, M.; Sanchez, N.; Sunagawa, S.; Torrejon, A.; Turner, K.; Vandemeulebrouck, G.; Varela, E.; Winogradsky, Y.; Zeller, G.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P.; Consortium, M., Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473* (7346), 174-80.
105. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K. S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Li, J.; Xu, J.; Li, S.; Li, D.; Cao, J.; Wang, B.; Liang, H.; Zheng, H.; Xie, Y.; Tap, J.; Lepage, P.; Bertalan, M.; Batto, J. M.; Hansen, T.; Le Paslier, D.; Linneberg, A.; Nielsen, H. B.; Pelletier, E.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; Turner, K.; Zhu, H.; Yu,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- C.; Jian, M.; Zhou, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Qin, N.; Yang, H.; Wang, J.; Brunak, S.; Doré, J.; Guarner, F.; Kristiansen, K.; Pedersen, O.; Parkhill, J.; Weissenbach, J.; Bork, P.; Ehrlich, S. D.; Consortium, M., A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464* (7285), 59-65.
106. Landman, C.; Quévrain, E., [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *Rev Med Interne* **2016**, *37* (6), 418-23.
107. Mills, S.; Stanton, C.; Lane, J. A.; Smith, G. J.; Ross, R. P., Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients* **2019**, *11* (4).
108. Frank, D. N.; Pace, N. R., Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* **2008**, *24* (1), 4-10.
109. Coudeyras, S.; Forestier, C., [Microbiota and probiotics: effects on human health]. *Can J Microbiol* **2010**, *56* (8), 611-50.
110. Spor, A.; Koren, O.; Ley, R., Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9* (4), 279-90.
111. Bernalier-Donadille, A., [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol* **2010**, *34* Suppl 1, S16-22.
112. Gallo, R. L.; Hooper, L. V., Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12* (7), 503-16.
113. Smith, K.; McCoy, K. D.; Macpherson, A. J., Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* **2007**, *19* (2), 59-69.
114. Rochat, F., [Biological effects of intestinal flora modifiers]. *Arch Pediatr* **2004**, *11* (6), 576-7.
115. Suzuki, K.; Ha, S. A.; Tsuji, M.; Fagarasan, S., Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol* **2007**, *19* (2), 127-35.
116. Wang, T.; Cai, G.; Qiu, Y.; Fei, N.; Zhang, M.; Pang, X.; Jia, W.; Cai, S.; Zhao, L., Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J* **2012**, *6* (2), 320-9.
117. Matheus, V. A.; Monteiro, L.; Oliveira, R. B.; Maschio, D. A.; Collares-Buzato, C. B., Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice. *Exp Biol Med (Maywood)* **2017**, *242* (12), 1214-1226.
118. Aagaard, K.; Ma, J.; Antony, K. M.; Ganu, R.; Petrosino, J.; Versalovic, J., The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **2014**, *6* (237), 237ra65.
119. Campeotto, F.; Suau, A.; Kapel, N.; Magne, F.; Viallon, V.; Ferraris, L.; Waligora-Dupriet, A. J.; Soulaïnes, P.; Leroux, B.; Kalach, N.; Dupont, C.; Butel, M. J., A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *Br J Nutr* **2011**, *105* (12), 1843-51.
120. Yatsunenkov, T.; Rey, F. E.; Manary, M. J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M. G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R. N.; Anokhin, A. P.; Heath, A. C.; Warner, B.; Reeder, J.; Kuczynski, J.; Caporaso, J. G.; Lozupone, C. A.; Lauber, C.; Clemente, J. C.; Knights, D.; Knight, R.; Gordon, J. I., Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **2012**, *486* (7402), 222-7.
121. Quigley, E. M. M.; Gajula, P., Recent advances in modulating the microbiome. *F1000Res* **2020**, *9*.
122. David, L. A.; Maurice, C. F.; Carmody, R. N.; Gootenberg, D. B.; Button, J. E.; Wolfe, B. E.; Ling, A. V.; Devlin, A. S.; Varma, Y.; Fischbach, M. A.; Biddinger, S. B.; Dutton, R. J.; Turnbaugh, P. J., Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **2014**, *505* (7484), 559-63.
123. Kovatcheva-Datchary, P.; Nilsson, A.; Akrami, R.; Lee, Y. S.; De Vadder, F.; Arora, T.; Hallen, A.; Martens, E.; Björck, I.; Bäckhed, F., Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab* **2015**, *22* (6), 971-82.
124. Walker, A. W.; Ince, J.; Duncan, S. H.; Webster, L. M.; Holtrop, G.; Ze, X.; Brown, D.; Stares, M. D.; Scott, P.; Bergerat, A.; Louis, P.; McIntosh, F.; Johnstone, A. M.; Loble, G. E.;

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Parkhill, J.; Flint, H. J., Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* **2011**, *5* (2), 220-30.
125. Thaiss, C. A.; Zeevi, D.; Levy, M.; Zilberman-Schapira, G.; Suez, J.; Tengeler, A. C.; Abramson, L.; Katz, M. N.; Korem, T.; Zmora, N.; Kuperman, Y.; Biton, I.; Gilad, S.; Harmelin, A.; Shapiro, H.; Halpern, Z.; Segal, E.; Elinav, E., Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* **2014**, *159* (3), 514-29.
126. Sonnenburg, J. L.; Bäckhed, F., Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* **2016**, *535* (7610), 56-64.
127. Yan, A. W.; Fouts, D. E.; Brandl, J.; Stärkel, P.; Torralba, M.; Schott, E.; Tsukamoto, H.; Nelson, K. E.; Brenner, D. A.; Schnabl, B., Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* **2011**, *53* (1), 96-105.
128. Kirpich, I. A.; Solovieva, N. V.; Leikhter, S. N.; Shidakova, N. A.; Lebedeva, O. V.; Sidorov, P. I.; Bazhukova, T. A.; Soloviev, A. G.; Barve, S. S.; McClain, C. J.; Cave, M., Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* **2008**, *42* (8), 675-82.
129. Adachi, Y.; Moore, L. E.; Bradford, B. U.; Gao, W.; Thurman, R. G., Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* **1995**, *108* (1), 218-24.
130. Dethlefsen, L.; Huse, S.; Sogin, M. L.; Relman, D. A., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* **2008**, *6* (11), e280.
131. Arboleya, S.; Watkins, C.; Stanton, C.; Ross, R. P., Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1204.
132. Nogacka, A. M.; Salazar, N.; Arboleya, S.; Suárez, M.; Fernández, N.; Solís, G.; de Los Reyes-Gavilán, C. G.; Gueimonde, M., Early microbiota, antibiotics and health. *Cell Mol Life Sci* **2018**, *75* (1), 83-91.
133. Singh, A.; Cresci, G. A.; Kirby, D. F., Proton Pump Inhibitors: Risks and Rewards and Emerging Consequences to the Gut Microbiome. *Nutr Clin Pract* **2018**, *33* (5), 614-624.
134. Minalyan, A.; Gabrielyan, L.; Scott, D.; Jacobs, J.; Pisegna, J. R., The Gastric and Intestinal Microbiome: Role of Proton Pump Inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep* **2017**, *19* (8), 42.
135. Leonard, J.; Marshall, J. K.; Moayyedi, P., Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol* **2007**, *102* (9), 2047-56; quiz 2057.
136. Lee, H.; Ko, G., Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80* (19), 5935-43.
137. Vallianou, N. G.; Stratigou, T.; Tsagarakis, S., Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. *Hormones (Athens)* **2019**, *18* (2), 141-144.
138. Roager, H. M.; Hansen, L. B.; Bahl, M. I.; Frandsen, H. L.; Carvalho, V.; Gøbel, R. J.; Dalgaard, M. D.; Plichta, D. R.; Sparholt, M. H.; Vestergaard, H.; Hansen, T.; Sicheritz-Pontén, T.; Nielsen, H. B.; Pedersen, O.; Lauritzen, L.; Kristensen, M.; Gupta, R.; Licht, T. R., Colonic transit time is related to bacterial metabolism and mucosal turnover in the gut. *Nat Microbiol* **2016**, *1* (9), 16093.
139. Vich Vila, A.; Collij, V.; Sanna, S.; Sinha, T.; Imhann, F.; Bourgonje, A. R.; Mujagic, Z.; Jonkers, D. M. A. E.; Masclee, A. A. M.; Fu, J.; Kurilshikov, A.; Wijmenga, C.; Zhernakova, A.; Weersma, R. K., Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 362.
140. DeVries, J. W., On defining dietary fibre. *Proc Nutr Soc* **2003**, *62* (1), 37-43.
141. McRorie, J. W., Evidence-Based Approach to Fiber Supplements and Clinically Meaningful Health Benefits, Part 1: What to Look for and How to Recommend an Effective Fiber Therapy. *Nutr Today* **2015**, *50* (2), 82-89.
142. do Carmo, M. M.; Walker, J. C.; Novello, D.; Caselato, V. M.; Sgarbieri, V. C.; Ouwehand, A. C.; Andreollo, N. A.; Hiane, P. A.; Dos Santos, E. F., Polydextrose: Physiological Function, and Effects on Health. *Nutrients* **2016**, *8* (9).
143. Chung, W. S.; Walker, A. W.; Louis, P.; Parkhill, J.; Vermeiren, J.; Bosscher, D.; Duncan, S. H.; Flint, H. J., Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol* **2016**, *14*, 3.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

144. Fåk, F.; Jakobsdottir, G.; Kulcinskaja, E.; Marungruang, N.; Matziouridou, C.; Nilsson, U.; Ståhlbrand, H.; Nyman, M., The physico-chemical properties of dietary fibre determine metabolic responses, short-chain Fatty Acid profiles and gut microbiota composition in rats fed low- and high-fat diets. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0127252.
145. Bozzetto, L.; Costabile, G.; Della Pepa, G.; Ciciola, P.; Vetrani, C.; Vitale, M.; Rivellese, A. A.; Annuzzi, G., Dietary Fibre as a Unifying Remedy for the Whole Spectrum of Obesity-Associated Cardiovascular Risk. *Nutrients* **2018**, *10* (7).
146. Jones, P. J., Dietary agents that target gastrointestinal and hepatic handling of bile acids and cholesterol. *J Clin Lipidol* **2008**, *2* (2), S4-S10.
147. Holscher, H. D., Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **2017**, *8* (2), 172-184.
148. Cremon, C.; Barbaro, M. R.; Ventura, M.; Barbara, G., Pre- and probiotic overview. *Curr Opin Pharmacol* **2018**, *43*, 87-92.
149. Makki, K.; Deehan, E. C.; Walter, J.; Bäckhed, F., The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, *23* (6), 705-715.
150. A.M.M, C., Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. M, A.; M, P., Eds. <div data-canvas-width="187.5444419856901" style="padding: 0px; margin: 0px; color: transparent; position: absolute; white-space: pre; cursor: text; transform-origin: 0% 0%; background-color: rgb(255, 255, 255); left: 161.636px; top: 94.536px; font-size: 14.2554px; font-family: serif; transform: scaleX(0.981064);">Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2 biotechnol. agron. soc. environ, 2011; Vol. 55, pp 153-164.
151. Mohnen, D., Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **2008**, *11* (3), 266-77.
152. Chan, S. Y.; Choo, W. S.; Young, D. J.; Loh, X. J., Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr Polym* **2017**, *161*, 118-139.
153. DEUEL, H.; STUTZ, E., Pectic substances and pectic enzymes. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **1958**, *20*, 341-82.
154. Naqash, F.; Masoodi, F. A.; Rather, S. A.; Wani, S. M.; Gani, A., Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin-A Review. *Carbohydr Polym* **2017**, *168*, 227-239.
155. Gunness, P.; Gidley, M. J., Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct* **2010**, *1* (2), 149-55.
156. Larsen, N.; Bussolo de Souza, C.; Krych, L.; Barbosa Cahú, T.; Wiese, M.; Kot, W.; Hansen, K. M.; Blennow, A.; Venema, K.; Jespersen, L., Potential of Pectins to Beneficially Modulate the Gut Microbiota Depends on Their Structural Properties. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 223.
157. Chu, H.; Duan, Y.; Yang, L.; Schnabl, B., Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* **2019**, *68* (2), 359-370.
158. Brandl, K.; Kumar, V.; Eckmann, L., Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2017**, *312* (5), G413-G419.
159. Kolodziejczyk, A. A.; Zheng, D.; Shibolet, O.; Elinav, E., The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med* **2019**, *11* (2).
160. Tripathi, A.; Debelius, J.; Brenner, D. A.; Karin, M.; Loomba, R.; Schnabl, B.; Knight, R., The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2018**, *15* (7), 397-411.
161. Natividad, J. M.; Verdu, E. F., Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res* **2013**, *69* (1), 42-51.
162. Graziani, C.; Talocco, C.; De Sire, R.; Petito, V.; Lopetuso, L. R.; Gervasoni, J.; Persichilli, S.; Franceschi, F.; Ojetti, V.; Gasbarrini, A.; Scaldaferri, F., Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and assessment modalities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2019**, *23* (2), 795-810.
163. Banerjee, A.; McKinley, E. T.; von Moltke, J.; Coffey, R. J.; Lau, K. S., Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. *J Clin Invest* **2018**, *128* (5), 1711-1719.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

164. Albac, S.; Schmitz, A.; Lopez-Alayon, C.; d'Enfert, C.; Sautour, M.; Ducreux, A.; Labruère-Chazal, C.; Laue, M.; Holland, G.; Bonnin, A.; Dalle, F., *Candida albicans* is able to use M cells as a portal of entry across the intestinal barrier in vitro. *Cell Microbiol* **2016**, *18* (2), 195-210.
165. Allaire, J. M.; Crowley, S. M.; Law, H. T.; Chang, S. Y.; Ko, H. J.; Vallance, B. A., The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol* **2018**, *39* (9), 677-696.
166. Hammer, A. M.; Morris, N. L.; Earley, Z. M.; Choudhry, M. A., The First Line of Defense: The Effects of Alcohol on Post-Burn Intestinal Barrier, Immune Cells, and Microbiome. *Alcohol Res* **2015**, *37* (2), 209-22.
167. Johansson, M. E.; Larsson, J. M.; Hansson, G. C., The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* Suppl 1, 4659-65.
168. Hartmann, P.; Seebauer, C. T.; Mazagova, M.; Horvath, A.; Wang, L.; Llorente, C.; Varki, N. M.; Brandl, K.; Ho, S. B.; Schnabl, B., Deficiency of intestinal mucin-2 protects mice from diet-induced fatty liver disease and obesity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2016**, *310* (5), G310-22.
169. Genser, L.; Poitou, C.; Brot-Laroche, É.; Rousset, M.; Vaillant, J. C.; Clément, K.; Thenet, S.; Leturque, A., [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. *Med Sci (Paris)* **2016**, *32* (5), 461-9.
170. Bevins, C. L.; Salzman, N. H., Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9* (5), 356-68.
171. Peterson, L. W.; Artis, D., Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14* (3), 141-53.
172. Arnolds, K. L.; Lozupone, C. A., Striking a Balance with Help from our Little Friends - How the Gut Microbiota Contributes to Immune Homeostasis. *Yale J Biol Med* **2016**, *89* (3), 389-395.
173. Lamas, B.; Natividad, J. M.; Sokol, H., Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunol* **2018**, *11* (4), 1024-1038.
174. Hu, H.; Lin, A.; Kong, M.; Yao, X.; Yin, M.; Xia, H.; Ma, J.; Liu, H., Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol* **2020**, *55* (2), 142-158.
175. Tilg, H.; Zmora, N.; Adolph, T. E.; Elinav, E., The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20* (1), 40-54.
176. Chu, H.; Williams, B.; Schnabl, B., Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. *Liver Res* **2018**, *2* (1), 43-51.
177. Safari, Z.; Gérard, P., The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci* **2019**, *76* (8), 1541-1558.
178. Brandl, K.; Schnabl, B., Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* **2017**, *33* (3), 128-133.
179. Gäbele, E.; Dostert, K.; Hofmann, C.; Wiest, R.; Schölmerich, J.; Hellerbrand, C.; Obermeier, F., DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol* **2011**, *55* (6), 1391-9.
180. Miura, K.; Ohnishi, H., Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (23), 7381-91.
181. Birchenough, G.; Schroeder, B. O.; Bäckhed, F.; Hansson, G. C., Dietary destabilisation of the balance between the microbiota and the colonic mucus barrier. *Gut Microbes* **2019**, *10* (2), 246-250.
182. Bäckhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L. V.; Koh, G. Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C. F.; Gordon, J. I., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (44), 15718-23.
183. Wahlström, A., Outside the liver box: The gut microbiota as pivotal modulator of liver diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2019**, *1865* (5), 912-919.
184. Llorente, C.; Schnabl, B., The gut microbiota and liver disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2015**, *1* (3), 275-284.
185. Kallus, S. J.; Brandt, L. J., The intestinal microbiota and obesity. *J Clin Gastroenterol* **2012**, *46* (1), 16-24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

186. Spencer, M. D.; Hamp, T. J.; Reid, R. W.; Fischer, L. M.; Zeisel, S. H.; Fodor, A. A., Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* **2011**, *140* (3), 976-86.
187. Vijay-Kumar, M.; Aitken, J. D.; Carvalho, F. A.; Cullender, T. C.; Mwangi, S.; Srinivasan, S.; Sitaraman, S. V.; Knight, R.; Ley, R. E.; Gewirtz, A. T., Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* **2010**, *328* (5975), 228-31.
188. Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Jin, C.; Hao, L.; Mehal, W. Z.; Strowig, T.; Thaiss, C. A.; Kau, A. L.; Eisenbarth, S. C.; Jurczak, M. J.; Camporez, J. P.; Shulman, G. I.; Gordon, J. I.; Hoffman, H. M.; Flavell, R. A., Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* **2012**, *482* (7384), 179-85.
189. Le Roy, T.; Llopis, M.; Lepage, P.; Bruneau, A.; Rabot, S.; Bevilacqua, C.; Martin, P.; Philippe, C.; Walker, F.; Bado, A.; Perlemuter, G.; Cassard-Doulcier, A. M.; Gérard, P., Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **2013**, *62* (12), 1787-94.
190. Chiu, C. C.; Ching, Y. H.; Li, Y. P.; Liu, J. Y.; Huang, Y. T.; Huang, Y. W.; Yang, S. S.; Huang, W. C.; Chuang, H. L., Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Exacerbated in High-Fat Diet-Fed Gnotobiotic Mice by Colonization with the Gut Microbiota from Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients* **2017**, *9* (11).
191. AM, C., Intestinal microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. C., H.; D., C., Eds. *Nutrients*, 2020.
192. Wang, B.; Jiang, X.; Cao, M.; Ge, J.; Bao, Q.; Tang, L.; Chen, Y.; Li, L., Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* **2016**, *6*, 32002.
193. Lelouvier, B.; Servant, F.; Païssé, S.; Brunet, A. C.; Benyahya, S.; Serino, M.; Valle, C.; Ortiz, M. R.; Puig, J.; Courtney, M.; Federici, M.; Fernández-Real, J. M.; Burcelin, R.; Amar, J., Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology* **2016**, *64* (6), 2015-2027.
194. Zhu, L.; Baker, S. S.; Gill, C.; Liu, W.; Alkhoury, R.; Baker, R. D.; Gill, S. R., Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* **2013**, *57* (2), 601-9.
195. Boursier, J.; Mueller, O.; Barret, M.; Machado, M.; Fizanne, L.; Araujo-Perez, F.; Guy, C. D.; Seed, P. C.; Rawls, J. F.; David, L. A.; Hunault, G.; Oberti, F.; Calès, P.; Diehl, A. M., 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), 764-75.
196. Michail, S.; Lin, M.; Frey, M. R.; Fanter, R.; Paliy, O.; Hilbush, B.; Reo, N. V., Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol Ecol* **2015**, *91* (2), 1-9.
197. Aron-Wisnewsky, J.; Vigiotti, C.; Witjes, J.; Le, P.; Holleboom, A. G.; Verheij, J.; Nieuwdorp, M.; Clément, K., Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2020**, *17* (5), 279-297.
198. Delzenne, N. M.; Cani, P. D., Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep* **2011**, *11* (3), 154-9.
199. Hoyles, L.; Fernández-Real, J. M.; Federici, M.; Serino, M.; Abbott, J.; Charpentier, J.; Heymes, C.; Luque, J. L.; Anthony, E.; Barton, R. H.; Chilloux, J.; Myridakis, A.; Martinez-Gili, L.; Moreno-Navarrete, J. M.; Benhamed, F.; Azalbert, V.; Blasco-Baque, V.; Puig, J.; Xifra, G.; Ricart, W.; Tomlinson, C.; Woodbridge, M.; Cardellini, M.; Davato, F.; Cardolini, I.; Porzio, O.; Gentileschi, P.; Lopez, F.; Fougelle, F.; Butcher, S. A.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Postic, C.; Burcelin, R.; Dumas, M. E., Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nat Med* **2018**, *24* (7), 1070-1080.
200. Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B. J.; Koeth, R.; Levison, B. S.; Dugar, B.; Feldstein, A. E.; Britt, E. B.; Fu, X.; Chung, Y. M.; Wu, Y.; Schauer, P.; Smith, J. D.; Allayee, H.; Tang, W. H.;

- DiDonato, J. A.; Lusi, A. J.; Hazen, S. L., Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **2011**, 472 (7341), 57-63.
201. Shen, F.; Zheng, R. D.; Sun, X. Q.; Ding, W. J.; Wang, X. Y.; Fan, J. G., Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2017**, 16 (4), 375-381.
202. Raman, M.; Ahmed, I.; Gillevet, P. M.; Probert, C. S.; Ratcliffe, N. M.; Smith, S.; Greenwood, R.; Sikaroodi, M.; Lam, V.; Crotty, P.; Bailey, J.; Myers, R. P.; Rioux, K. P., Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2013**, 11 (7), 868-75.e1-3.
203. Chen, Y.; Yang, F.; Lu, H.; Wang, B.; Lei, D.; Wang, Y.; Zhu, B.; Li, L., Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* **2011**, 54 (2), 562-72.
204. Del Chierico, F.; Nobili, V.; Vernocchi, P.; Russo, A.; De Stefanis, C.; Gnani, D.; Furlanello, C.; Zandonà, A.; Paci, P.; Capuani, G.; Dallapiccola, B.; Micheli, A.; Alisi, A.; Putignani, L., Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology* **2017**, 65 (2), 451-464.
205. Wong, V. W.; Tse, C. H.; Lam, T. T.; Wong, G. L.; Chim, A. M.; Chu, W. C.; Yeung, D. K.; Law, P. T.; Kwan, H. S.; Yu, J.; Sung, J. J.; Chan, H. L., Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PLoS One* **2013**, 8 (4), e62885.
206. Bajaj, J. S.; Heuman, D. M.; Hylemon, P. B.; Sanyal, A. J.; White, M. B.; Monteith, P.; Noble, N. A.; Unser, A. B.; Daita, K.; Fisher, A. R.; Sikaroodi, M.; Gillevet, P. M., Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J Hepatol* **2014**, 60 (5), 940-7.
207. Kimura, I.; Ozawa, K.; Inoue, D.; Imamura, T.; Kimura, K.; Maeda, T.; Terasawa, K.; Kashiwara, D.; Hirano, K.; Tani, T.; Takahashi, T.; Miyauchi, S.; Shioi, G.; Inoue, H.; Tsujimoto, G., The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* **2013**, 4, 1829.
208. den Besten, G.; Bleeker, A.; Gerding, A.; van Eunen, K.; Havinga, R.; van Dijk, T. H.; Oosterveer, M. H.; Jonker, J. W.; Groen, A. K.; Reijngoud, D. J.; Bakker, B. M., Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* **2015**, 64 (7), 2398-408.
209. Sahuri-Arisoylu, M.; Brody, L. P.; Parkinson, J. R.; Parkes, H.; Navaratnam, N.; Miller, A. D.; Thomas, E. L.; Frost, G.; Bell, J. D., Reprogramming of hepatic fat accumulation and 'browning' of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes (Lond)* **2016**, 40 (6), 955-63.
210. Ge, H.; Li, X.; Weiszmann, J.; Wang, P.; Baribault, H.; Chen, J. L.; Tian, H.; Li, Y., Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology* **2008**, 149 (9), 4519-26.
211. Hong, Y. H.; Nishimura, Y.; Hishikawa, D.; Tsuzuki, H.; Miyahara, H.; Gotoh, C.; Choi, K. C.; Feng, D. D.; Chen, C.; Lee, H. G.; Katoh, K.; Roh, S. G.; Sasaki, S., Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* **2005**, 146 (12), 5092-9.
212. Kondo, T.; Kishi, M.; Fushimi, T.; Kaga, T., Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *J Agric Food Chem* **2009**, 57 (13), 5982-6.
213. Yamashita, H.; Maruta, H.; Jozuka, M.; Kimura, R.; Iwabuchi, H.; Yamato, M.; Saito, T.; Fujisawa, K.; Takahashi, Y.; Kimoto, M.; Hiemori, M.; Tsuji, H., Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, 73 (3), 570-6.
214. Yamashita, H.; Fujisawa, K.; Ito, E.; Idei, S.; Kawaguchi, N.; Kimoto, M.; Hiemori, M.; Tsuji, H., Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, 71 (5), 1236-43.
215. Al-Lahham, S. H.; Peppelenbosch, M. P.; Roelofsen, H.; Vonk, R. J.; Venema, K., Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1801 (11), 1175-83.

216. Samuel, B. S.; Shaito, A.; Motoike, T.; Rey, F. E.; Backhed, F.; Manchester, J. K.; Hammer, R. E.; Williams, S. C.; Crowley, J.; Yanagisawa, M.; Gordon, J. I., Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (43), 16767-72.
217. Chambers, E. S.; Viardot, A.; Psichas, A.; Morrison, D. J.; Murphy, K. G.; Zac-Varghese, S. E.; MacDougall, K.; Preston, T.; Tedford, C.; Finlayson, G. S.; Blundell, J. E.; Bell, J. D.; Thomas, E. L.; Mt-Isa, S.; Ashby, D.; Gibson, G. R.; Kolida, S.; Dhillo, W. S.; Bloom, S. R.; Morley, W.; Clegg, S.; Frost, G., Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* **2015**, *64* (11), 1744-54.
218. De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Goncalves, D.; Vinera, J.; Zitoun, C.; Duchamp, A.; Bäckhed, F.; Mithieux, G., Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **2014**, *156* (1-2), 84-96.
219. Canfora, E. E.; Jocken, J. W.; Blaak, E. E., Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* **2015**, *11* (10), 577-91.
220. Aragonès, G.; González-García, S.; Aguilar, C.; Richart, C.; Auguet, T., Gut Microbiota-Derived Mediators as Potential Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 8507583.
221. Safari, Z.; Monnoye, M.; Abuja, P. M.; Mariadassou, M.; Kashofer, K.; Gérard, P.; Zatloukal, K., Steatosis and gut microbiota dysbiosis induced by high-fat diet are reversed by 1-week chow diet administration. *Nutr Res* **2019**, *71*, 72-88.
222. B., T., Short-Chain Fatty Acid Production and Functional Aspects on Host Metabolism. Elsevier: Human Microbiota in Health and Diseases, 2018; pp 37-106.
223. Koh, A.; De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Bäckhed, F., From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* **2016**, *165* (6), 1332-1345.
224. Milosevic, I.; Vujovic, A.; Barac, A.; Djelic, M.; Korac, M.; Radovanovic Spurnic, A.; Gmizic, I.; Stevanovic, O.; Djordjevic, V.; Lekic, N.; Russo, E.; Amedei, A., Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (2).
225. Aranha, M. M.; Cortez-Pinto, H.; Costa, A.; da Silva, I. B.; Camilo, M. E.; de Moura, M. C.; Rodrigues, C. M., Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2008**, *20* (6), 519-25.
226. Jiang, C.; Xie, C.; Li, F.; Zhang, L.; Nichols, R. G.; Krausz, K. W.; Cai, J.; Qi, Y.; Fang, Z. Z.; Takahashi, S.; Tanaka, N.; Desai, D.; Amin, S. G.; Albert, I.; Patterson, A. D.; Gonzalez, F. J., Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **2015**, *125* (1), 386-402.
227. Younossi, Z. M.; Ratziu, V.; Loomba, R.; Rinella, M.; Anstee, Q. M.; Goodman, Z.; Bedossa, P.; Geier, A.; Beckebaum, S.; Newsome, P. N.; Sheridan, D.; Sheikh, M. Y.; Trotter, J.; Knapple, W.; Lawitz, E.; Abdelmalek, M. F.; Kowdley, K. V.; Montano-Loza, A. J.; Boursier, J.; Mathurin, P.; Bugianesi, E.; Mazzella, G.; Olveira, A.; Cortez-Pinto, H.; Graupera, I.; Orr, D.; Gluud, L. L.; Dufour, J. F.; Shapiro, D.; Campagna, J.; Zaru, L.; MacConell, L.; Shringarpure, R.; Harrison, S.; Sanyal, A. J.; Investigators, R. S., Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* **2019**, *394* (10215), 2184-2196.
228. Barichon, C.; Correia, C.; Tordjmann, T., [Cholangiocyte proliferation induced by bile acids: impact of TGR5]. *Med Sci (Paris)* **2016**, *32* (6-7), 585-7.
229. Dumas, M. E.; Barton, R. H.; Toye, A.; Cloarec, O.; Blancher, C.; Rothwell, A.; Fearnside, J.; Tatoud, R.; Blanc, V.; Lindon, J. C.; Mitchell, S. C.; Holmes, E.; McCarthy, M. I.; Scott, J.; Gauguier, D.; Nicholson, J. K., Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (33), 12511-6.
230. Raucy, J. L.; Lasker, J.; Ozaki, K.; Zoleta, V., Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicol Sci* **2004**, *79* (2), 233-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

231. Yuan, J.; Chen, C.; Cui, J.; Lu, J.; Yan, C.; Wei, X.; Zhao, X.; Li, N.; Li, S.; Xue, G.; Cheng, W.; Li, B.; Li, H.; Lin, W.; Tian, C.; Zhao, J.; Han, J.; An, D.; Zhang, Q.; Wei, H.; Zheng, M.; Ma, X.; Li, W.; Chen, X.; Zhang, Z.; Zeng, H.; Ying, S.; Wu, J.; Yang, R.; Liu, D., Fatty Liver Disease Caused by High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Metab* **2019**, *30* (6), 1172.
232. Xie, C.; Haleboua-DeMarzio, D., Role of Probiotics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Does Gut Microbiota Matter? *Nutrients* **2019**, *11* (11).
233. Mestdagh, R.; Dumas, M. E.; Rezzi, S.; Kochhar, S.; Holmes, E.; Claus, S. P.; Nicholson, J. K., Gut microbiota modulate the metabolism of brown adipose tissue in mice. *J Proteome Res* **2012**, *11* (2), 620-30.
234. Suárez-Zamorano, N.; Fabbiano, S.; Chevalier, C.; Stojanović, O.; Colin, D. J.; Stevanović, A.; Veyrat-Durebex, C.; Tarallo, V.; Rigo, D.; Germain, S.; Ilievska, M.; Montet, X.; Seimille, Y.; Hapfelmeier, S.; Trajkovski, M., Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* **2015**, *21* (12), 1497-1501.
235. Moreno-Navarrete, J. M.; Fernandez-Real, J. M., The gut microbiota modulates both browning of white adipose tissue and the activity of brown adipose tissue. *Rev Endocr Metab Disord* **2019**, *20* (4), 387-397.
236. Chevalier, C.; Stojanović, O.; Colin, D. J.; Suarez-Zamorano, N.; Tarallo, V.; Veyrat-Durebex, C.; Rigo, D.; Fabbiano, S.; Stevanović, A.; Hagemann, S.; Montet, X.; Seimille, Y.; Zamboni, N.; Hapfelmeier, S.; Trajkovski, M., Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* **2015**, *163* (6), 1360-74.
237. Ziętak, M.; Kovatcheva-Datchary, P.; Markiewicz, L. H.; Ståhlman, M.; Kozak, L. P.; Bäckhed, F., Altered Microbiota Contributes to Reduced Diet-Induced Obesity upon Cold Exposure. *Cell Metab* **2016**, *23* (6), 1216-1223.
238. Zhou, L.; Xiao, X.; Zhang, Q.; Zheng, J.; Deng, M., Deciphering the Anti-obesity Benefits of Resveratrol: The "Gut Microbiota-Adipose Tissue" Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10*, 413.
239. Gao, J.; Xu, K.; Liu, H.; Liu, G.; Bai, M.; Peng, C.; Li, T.; Yin, Y., Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, *8*, 13.
240. Li, G.; Xie, C.; Lu, S.; Nichols, R. G.; Tian, Y.; Li, L.; Patel, D.; Ma, Y.; Brocker, C. N.; Yan, T.; Krausz, K. W.; Xiang, R.; Gavrilova, O.; Patterson, A. D.; Gonzalez, F. J., Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab* **2017**, *26* (4), 672-685.e4.
241. Wang, P.; Li, D.; Ke, W.; Liang, D.; Hu, X.; Chen, F., Resveratrol-induced gut microbiota reduces obesity in high-fat diet-fed mice. *Int J Obes (Lond)* **2020**, *44* (1), 213-225.
242. Han, X.; Guo, J.; You, Y.; Yin, M.; Liang, J.; Ren, C.; Zhan, J.; Huang, W., Vanillic acid activates thermogenesis in brown and white adipose tissue. *Food Funct* **2018**, *9* (8), 4366-4375.
243. Kobylak, N.; Virchenko, O.; Falalyeyeva, T., Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutr J* **2016**, *15*, 43.
244. Poeta, M.; Pierri, L.; Vajro, P., Gut-Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)* **2017**, *4* (8).
245. Acharya, C.; Bajaj, J. S., Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. *Gastroenterol Clin North Am* **2017**, *46* (1), 155-169.
246. Ibrahim, S. H.; Hirsova, P.; Malhi, H.; Gores, G. J., Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci* **2016**, *61* (5), 1325-36.
247. Van Herck, M. A.; Vonghia, L.; Francque, S. M., Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients* **2017**, *9* (10).
248. Nakae, D.; Mizumoto, Y.; Andoh, N.; Tamura, K.; Horiguchi, K.; Endoh, T.; Kobayashi, E.; Tsujiuchi, T.; Denda, A.; Lombardi, B., Comparative changes in the liver of female Fischer-344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic L-amino acid-defined choline-deficient diet. *Toxicol Pathol* **1995**, *23* (5), 583-90.
249. Zhong, F.; Zhou, X.; Xu, J.; Gao, L., Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestion* **2019**, 1-14.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

250. Vergnes, L.; Phan, J.; Strauss, M.; Tafuri, S.; Reue, K., Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* **2003**, *278* (44), 42774-84.
251. Ganz, M.; Bukong, T. N.; Csak, T.; Saha, B.; Park, J. K.; Ambade, A.; Kodys, K.; Szabo, G., Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J Transl Med* **2015**, *13*, 193.
252. Lambertz, J.; Weiskirchen, S.; Landert, S.; Weiskirchen, R., Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol* **2017**, *8*, 1159.
253. Ter Horst, K. W.; Serlie, M. J., Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* **2017**, *9* (9).
254. Mamikutty, N.; Thent, Z. C.; Sapri, S. R.; Sahrudin, N. N.; Mohd Yusof, M. R.; Haji Suhaimi, F., The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 263897.
255. Spruss, A.; Bergheim, I., Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* **2009**, *20* (9), 657-62.
256. Zou, Y.; Li, J.; Lu, C.; Wang, J.; Ge, J.; Huang, Y.; Zhang, L.; Wang, Y., High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* **2006**, *79* (11), 1100-7.
257. Kohli, R.; Kirby, M.; Xanthakos, S. A.; Softic, S.; Feldstein, A. E.; Saxena, V.; Tang, P. H.; Miles, L.; Miles, M. V.; Balistreri, W. F.; Woods, S. C.; Seeley, R. J., High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2010**, *52* (3), 934-44.
258. Charlton, M.; Krishnan, A.; Viker, K.; Sanderson, S.; Cazanave, S.; McConico, A.; Masuoko, H.; Gores, G., Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, *301* (5), G825-34.
259. Sellmann, C.; Prieb, J.; Landmann, M.; Degen, C.; Engstler, A. J.; Jin, C. J.; Gärttner, S.; Spruss, A.; Huber, O.; Bergheim, I., Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem* **2015**, *26* (11), 1183-92.
260. Lau, J. K.; Zhang, X.; Yu, J., Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol* **2017**, *241* (1), 36-44.
261. Recena Aydos, L.; Aparecida do Amaral, L.; Serafim de Souza, R.; Jacobowski, A. C.; Freitas Dos Santos, E.; Rodrigues Macedo, M. L., Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. *Nutrients* **2019**, *11* (12).
262. Longhi, R.; Almeida, R. F.; Machado, L.; Duarte, M. M. M. F.; Souza, D. G.; Machado, P.; de Assis, A. M.; Quincozes-Santos, A.; Souza, D. O., Effect of a trans fatty acid-enriched diet on biochemical and inflammatory parameters in Wistar rats. *Eur J Nutr* **2017**, *56* (3), 1003-1016.
263. Cahova, M.; Dankova, H.; Palenickova, E.; Papackova, Z.; Kazdova, L., The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on Fatty Acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome. *J Nutr Metab* **2012**, *2012*, 757205.
264. Ito, M.; Suzuki, J.; Sasaki, M.; Watanabe, K.; Tsujioka, S.; Takahashi, Y.; Gomori, A.; Hirose, H.; Ishihara, A.; Iwaasa, H.; Kanatani, A., Development of nonalcoholic steatohepatitis model through combination of high-fat diet and tetracycline with morbid obesity in mice. *Hepatol Res* **2006**, *34* (2), 92-8.
265. Kubota, N.; Kado, S.; Kano, M.; Masuoka, N.; Nagata, Y.; Kobayashi, T.; Miyazaki, K.; Ishikawa, F., A high-fat diet and multiple administration of carbon tetrachloride induces liver injury and pathological features associated with non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2013**, *40* (7), 422-30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

266. Jacobs, A.; Warda, A. S.; Verbeek, J.; Cassiman, D.; Spincemaille, P., An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Curr Protoc Mouse Biol* **2016**, *6* (2), 185-200.
267. Santhekadur, P. K.; Kumar, D. P.; Sanyal, A. J., Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **2018**, *68* (2), 230-237.
268. Ren, T.; Zhu, J.; Zhu, L.; Cheng, M., The Combination of Blueberry Juice and Probiotics Ameliorate Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) by Affecting SREBP-1c/PNPLA-3 Pathway via PPAR- α . *Nutrients* **2017**, *9* (3).
269. Okumura, K.; Ikejima, K.; Kon, K.; Abe, W.; Yamashina, S.; Enomoto, N.; Takei, Y.; Sato, N., Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A(y) mice. *Hepatol Res* **2006**, *36* (3), 217-28.
270. Lo, L.; McLennan, S. V.; Williams, P. F.; Bonner, J.; Chowdhury, S.; McCaughan, G. W.; Gorrell, M. D.; Yue, D. K.; Twigg, S. M., Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **2011**, *55* (2), 435-44.
271. Fujii, M.; Shibazaki, Y.; Wakamatsu, K.; Honda, Y.; Kawauchi, Y.; Suzuki, K.; Arumugam, S.; Watanabe, K.; Ichida, T.; Asakura, H.; Yoneyama, H., A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* **2013**, *46* (3), 141-52.
272. Yin, H. Q.; Kim, M.; Kim, J. H.; Kong, G.; Lee, M. O.; Kang, K. S.; Yoon, B. I.; Kim, H. L.; Lee, B. H., Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicol Sci* **2006**, *94* (1), 206-16.
273. Itoh, M.; Suganami, T.; Nakagawa, N.; Tanaka, M.; Yamamoto, Y.; Kamei, Y.; Terai, S.; Sakaida, I.; Ogawa, Y., Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* **2011**, *179* (5), 2454-63.
274. Leone, T. C.; Weinheimer, C. J.; Kelly, D. P., A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (13), 7473-8.
275. Hansen, H. H.; Feigh, M.; Veidal, S. S.; Rigbolt, K. T.; Vrang, N.; Fosgerau, K., Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov Today* **2017**, *22* (11), 1707-1718.
276. Schierwagen, R.; Maybüchen, L.; Zimmer, S.; Hittatiya, K.; Bäck, C.; Klein, S.; Uschner, F. E.; Reul, W.; Boor, P.; Nickenig, G.; Strassburg, C. P.; Trautwein, C.; Plat, J.; Lütjohann, D.; Sauerbruch, T.; Tacke, F.; Trebicka, J., Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep* **2015**, *5*, 12931.
277. Bieghs, V.; Trautwein, C., Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* **2014**, *3* (6), 377-85.
278. Imajo, K.; Yoneda, M.; Kessoku, T.; Ogawa, Y.; Maeda, S.; Sumida, Y.; Hyogo, H.; Eguchi, Y.; Wada, K.; Nakajima, A., Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci* **2013**, *14* (11), 21833-57.
279. Newman, K. M.; Rank, K. M.; Vaughn, B. P.; Khoruts, A., Treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection using fecal microbiota transplantation in patients with inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **2017**, *8* (3), 303-309.
280. Moayyedi, P.; Surette, M. G.; Kim, P. T.; Libertucci, J.; Wolfe, M.; Onischi, C.; Armstrong, D.; Marshall, J. K.; Kassam, Z.; Reinisch, W.; Lee, C. H., Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **2015**, *149* (1), 102-109.e6.
281. Macpherson, A. J.; Harris, N. L., Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **2004**, *4* (6), 478-85.
282. Johansson, M. E.; Jakobsson, H. E.; Holmén-Larsson, J.; Schütte, A.; Ermund, A.; Rodríguez-Piñero, A. M.; Arike, L.; Wising, C.; Svensson, F.; Bäckhed, F.; Hansson, G. C., Normalization of Host

- Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host Microbe* **2015**, *18* (5), 582-92.
283. Wrzosek, L.; Ciocan, D.; Borentain, P.; Spatz, M.; Puchois, V.; Hugot, C.; Ferrere, G.; Mayeur, C.; Perlemuter, G.; Cassard, A. M., Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 6854.
284. Arrieta, M. C.; Walter, J.; Finlay, B. B., Human Microbiota-Associated Mice: A Model with Challenges. *Cell Host Microbe* **2016**, *19* (5), 575-8.
285. Ryan, M. C.; Itsiopoulos, C.; Thodis, T.; Ward, G.; Trost, N.; Hofferberth, S.; O'Dea, K.; Desmond, P. V.; Johnson, N. A.; Wilson, A. M., The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **2013**, *59* (1), 138-43.
286. Parker, H. M.; Johnson, N. A.; Burdon, C. A.; Cohn, J. S.; O'Connor, H. T.; George, J., Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* **2012**, *56* (4), 944-51.
287. Singh, S.; Osna, N. A.; Kharbanda, K. K., Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol* **2017**, *23* (36), 6549-6570.
288. Miller, E. R.; Pastor-Barriuso, R.; Dalal, D.; Riemersma, R. A.; Appel, L. J.; Guallar, E., Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* **2005**, *142* (1), 37-46.
289. Theodotou, M.; Fokianos, K.; Moniatis, D.; Kadlenic, R.; Chryssikou, A.; Aristotelous, A.; Mouzouridou, A.; Diakides, J.; Stavrou, E., Effect of resveratrol on non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* **2019**, *18* (1), 559-565.
290. Lee, Y.; Doumouras, A. G.; Yu, J.; Brar, K.; Banfield, L.; Gmora, S.; Anvari, M.; Hong, D., Complete Resolution of Nonalcoholic Fatty Liver Disease After Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2019**, *17* (6), 1040-1060.e11.
291. (EASL), E. A. f. t. S. o. t. L.; (EASD), E. A. f. t. S. o. D.; (EASO), E. A. f. t. S. o. O., EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **2016**, *64* (6), 1388-402.
292. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J. E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S. A.; Brunt, E. M.; Sanyal, A. J., The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67* (1), 328-357.
293. Leoni, S.; Tovoli, F.; Napoli, L.; Serio, I.; Ferri, S.; Bolondi, L., Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol* **2018**, *24* (30), 3361-3373.
294. Snyder, H. S.; Sakaan, S. A.; March, K. L.; Siddique, O.; Cholankeril, R.; Cummings, C. D.; Gadiparthi, C.; Satapathy, S. K.; Ahmed, A.; Cholankeril, G., Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Anti-diabetic Pharmacologic Therapies. *J Clin Transl Hepatol* **2018**, *6* (2), 168-174.
295. Blazina, I.; Selph, S., Diabetes drugs for nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Syst Rev* **2019**, *8* (1), 295.
296. Neuschwander-Tetri, B. A.; Loomba, R.; Sanyal, A. J.; Lavine, J. E.; Van Natta, M. L.; Abdelmalek, M. F.; Chalasani, N.; Dasarathy, S.; Diehl, A. M.; Hameed, B.; Kowdley, K. V.; McCullough, A.; Terrault, N.; Clark, J. M.; Tonascia, J.; Brunt, E. M.; Kleiner, D. E.; Doo, E.; Network, N. C. R., Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **2015**, *385* (9972), 956-65.
297. Neuschwander-Tetri, B. A.; Brunt, E. M.; Wehmeier, K. R.; Oliver, D.; Bacon, B. R., Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology* **2003**, *38* (4), 1008-17.
298. Baumeier, C.; Saussenthaler, S.; Kammel, A.; Jähnert, M.; Schlüter, L.; Hesse, D.; Canouil, M.; Lobbens, S.; Caiazzo, R.; Raverdy, V.; Pattou, F.; Nilsson, E.; Pihlajamäki, J.; Ling, C.; Froguel,

- P.; Schürmann, A.; Schwenk, R. W., Hepatic DPP4 DNA Methylation Associates With Fatty Liver. *Diabetes* **2017**, *66* (1), 25-35.
299. Facciorusso, A.; Abd El Aziz, M. A.; Singh, S.; Pusceddu, S.; Milione, M.; Giacomelli, L.; Sacco, R., Statin Use Decreases the Incidence of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (4).
300. Nakade, Y.; Murotani, K.; Inoue, T.; Kobayashi, Y.; Yamamoto, T.; Ishii, N.; Ohashi, T.; Ito, K.; Fukuzawa, Y.; Yoneda, M., Ezetimibe for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Hepatol Res* **2017**, *47* (13), 1417-1428.
301. Esler, W. P.; Bence, K. K., Metabolic Targets in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2019**, *8* (2), 247-267.
302. Syed-Abdul, M. M.; Parks, E. J.; Gaballah, A. H.; Bingham, K.; Hammoud, G. M.; Kemble, G.; Buckley, D.; McCulloch, W.; Manrique-Acevedo, C., Fatty Acid Synthase Inhibitor TVB-2640 Reduces Hepatic de Novo Lipogenesis in Males With Metabolic Abnormalities. *Hepatology* **2019**.
303. Choi, C. S.; Savage, D. B.; Kulkarni, A.; Yu, X. X.; Liu, Z. X.; Morino, K.; Kim, S.; Distefano, A.; Samuel, V. T.; Neschen, S.; Zhang, D.; Wang, A.; Zhang, X. M.; Kahn, M.; Cline, G. W.; Pandey, S. K.; Geisler, J. G.; Bhanot, S.; Monia, B. P.; Shulman, G. I., Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem* **2007**, *282* (31), 22678-88.
304. Yu, X. X.; Murray, S. F.; Pandey, S. K.; Booten, S. L.; Bao, D.; Song, X. Z.; Kelly, S.; Chen, S.; McKay, R.; Monia, B. P.; Bhanot, S., Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology* **2005**, *42* (2), 362-71.
305. Úbeda, M.; Lario, M.; Muñoz, L.; Borrero, M. J.; Rodríguez-Serrano, M.; Sánchez-Díaz, A. M.; Del Campo, R.; Lledó, L.; Pastor, Ó.; García-Bermejo, L.; Díaz, D.; Álvarez-Mon, M.; Albillos, A., Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *J Hepatol* **2016**, *64* (5), 1049-1057.
306. Tølbøl, K. S.; Kristiansen, M. N.; Hansen, H. H.; Veidal, S. S.; Rigbolt, K. T.; Gillum, M. P.; Jelsing, J.; Vrang, N.; Feigh, M., Metabolic and hepatic effects of liraglutide, obeticholic acid and elafibranor in diet-induced obese mouse models of biopsy-confirmed nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **2018**, *24* (2), 179-194.
307. Wiest, R.; Albillos, A.; Trauner, M.; Bajaj, J. S.; Jalan, R., Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J Hepatol* **2017**, *67* (5), 1084-1103.
308. Yokohama, S.; Yoneda, M.; Haneda, M.; Okamoto, S.; Okada, M.; Aso, K.; Hasegawa, T.; Tokusashi, Y.; Miyokawa, N.; Nakamura, K., Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2004**, *40* (5), 1222-5.
309. Georgescu, E. F.; Ionescu, R.; Niculescu, M.; Mogoanta, L.; Vancica, L., Angiotensin-receptor blockers as therapy for mild-to-moderate hypertension-associated non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **2009**, *15* (8), 942-54.
310. Hirata, T.; Tomita, K.; Kawai, T.; Yokoyama, H.; Shimada, A.; Kikuchi, M.; Hirose, H.; Ebinuma, H.; Irie, J.; Ojio, K.; Oikawa, Y.; Saito, H.; Itoh, H.; Hibi, T., Effect of Telmisartan or Losartan for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Fatty Liver Protection Trial by Telmisartan or Losartan Study (FANTASY). *Int J Endocrinol* **2013**, *2013*, 587140.
311. Borém, L. M. A.; Neto, J. F. R.; Brandi, I. V.; Lelis, D. F.; Santos, S. H. S., The role of the angiotensin II type I receptor blocker telmisartan in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Hypertens Res* **2018**, *41* (6), 394-405.
312. Kudo, H.; Yata, Y.; Takahara, T.; Kawai, K.; Nakayama, Y.; Kanayama, M.; Oya, T.; Morita, S.; Sasahara, M.; Mann, D. A.; Sugiyama, T., Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. *Liver Int* **2009**, *29* (7), 988-96.
313. Gangarapu, V.; Ince, A. T.; Baysal, B.; Kayar, Y.; Kılıç, U.; Gök, Ö.; Uysal, Ö.; Şentürk, H., Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2015**, *27* (7), 840-5.

314. Eslamparast, T.; Poustchi, H.; Zamani, F.; Sharafkhan, M.; Malekzadeh, R.; Hekmatdoost, A., Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr* **2014**, *99* (3), 535-42.
315. Aller, R.; De Luis, D. A.; Izaola, O.; Conde, R.; Gonzalez Sagrado, M.; Primo, D.; De La Fuente, B.; Gonzalez, J., Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2011**, *15* (9), 1090-5.
316. Meroni, M.; Longo, M.; Dongiovanni, P., The Role of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A New Insight into Therapeutic Strategies. *Nutrients* **2019**, *11* (11).
317. De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Zitoun, C.; Duchamp, A.; Bäckhed, F.; Mithieux, G., Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab* **2016**, *24* (1), 151-7.
318. Pedersen, H. K.; Gudmundsdottir, V.; Nielsen, H. B.; Hyötyläinen, T.; Nielsen, T.; Jensen, B. A.; Forslund, K.; Hildebrand, F.; Prifti, E.; Falony, G.; Le Chatelier, E.; Levenez, F.; Doré, J.; Mattila, I.; Plichta, D. R.; Pöhö, P.; Hellgren, L. I.; Arumugam, M.; Sunagawa, S.; Vieira-Silva, S.; Jørgensen, T.; Holm, J. B.; Trošt, K.; Kristiansen, K.; Brix, S.; Raes, J.; Wang, J.; Hansen, T.; Bork, P.; Brunak, S.; Oresic, M.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O.; Consortium, M., Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **2016**, *535* (7612), 376-81.
319. Cani, P. D., Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **2018**, *67* (9), 1716-1725.
320. Shin, N. R.; Lee, J. C.; Lee, H. Y.; Kim, M. S.; Whon, T. W.; Lee, M. S.; Bae, J. W., An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **2014**, *63* (5), 727-35.
321. Plovier, H.; Everard, A.; Druart, C.; Depommier, C.; Van Hul, M.; Geurts, L.; Chilloux, J.; Ottman, N.; Duparc, T.; Lichtenstein, L.; Myridakis, A.; Delzenne, N. M.; Klievink, J.; Bhattacharjee, A.; van der Ark, K. C.; Aalvink, S.; Martinez, L. O.; Dumas, M. E.; Maiter, D.; Loumaye, A.; Hermans, M. P.; Thissen, J. P.; Belzer, C.; de Vos, W. M.; Cani, P. D., A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* **2017**, *23* (1), 107-113.
322. Anhe, F. F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S.; Varin, T. V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; Marette, A., A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* **2015**, *64* (6), 872-83.
323. Greer, R. L.; Dong, X.; Moraes, A. C.; Zielke, R. A.; Fernandes, G. R.; Peremyslova, E.; Vasquez-Perez, S.; Schoenborn, A. A.; Gomes, E. P.; Pereira, A. C.; Ferreira, S. R.; Yao, M.; Fuss, I. J.; Strober, W.; Sikora, A. E.; Taylor, G. A.; Gulati, A. S.; Morgun, A.; Shulzhenko, N., Akkermansia muciniphila mediates negative effects of IFN γ on glucose metabolism. *Nat Commun* **2016**, *7*, 13329.
324. Berer, K.; Gerdes, L. A.; Cekanaviciute, E.; Jia, X.; Xiao, L.; Xia, Z.; Liu, C.; Klotz, L.; Stauffer, U.; Baranzini, S. E.; Kümpfel, T.; Hohlfeld, R.; Krishnamoorthy, G.; Wekerle, H., Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (40), 10719-10724.
325. Cekanaviciute, E.; Yoo, B. B.; Runia, T. F.; Debelius, J. W.; Singh, S.; Nelson, C. A.; Kanner, R.; Bencosme, Y.; Lee, Y. K.; Hauser, S. L.; Crabtree-Hartman, E.; Sand, I. K.; Gacias, M.; Zhu, Y.; Casaccia, P.; Cree, B. A. C.; Knight, R.; Mazmanian, S. K.; Baranzini, S. E., Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (40), 10713-10718.
326. Loman, B. R.; Hernández-Saavedra, D.; An, R.; Rector, R. S., Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* **2018**, *76* (11), 822-839.
327. Cani, P. D.; Neyrinck, A. M.; Fava, F.; Knäuf, C.; Burcelin, R. G.; Tuohy, K. M.; Gibson, G. R.; Delzenne, N. M., Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced

- diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **2007**, *50* (11), 2374-83.
328. Delzenne, N. M.; Neyrinck, A. M.; Cani, P. D., Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* **2013**, *109 Suppl 2*, S81-5.
329. Zheng, J.; Yuan, X.; Cheng, G.; Jiao, S.; Feng, C.; Zhao, X.; Yin, H.; Du, Y.; Liu, H., Chitosan oligosaccharides improve the disturbance in glucose metabolism and reverse the dysbiosis of gut microbiota in diabetic mice. *Carbohydr Polym* **2018**, *190*, 77-86.
330. Bomhof, M. R.; Parnell, J. A.; Ramay, H. R.; Crotty, P.; Rioux, K. P.; Probert, C. S.; Jayakumar, S.; Raman, M.; Reimer, R. A., Histological improvement of non-alcoholic steatohepatitis with a prebiotic: a pilot clinical trial. *Eur J Nutr* **2019**, *58* (4), 1735-1745.
331. Li, W.; Zhang, K.; Yang, H., Pectin Alleviates High Fat (Lard) Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice: Possible Role of Short-Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Regulated by Pectin. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (30), 8015-8025.
332. Newman, K. M.; Vaughn, B. P., Efficacy of intestinal microbiota transplantation in ulcerative colitis: a review of current literature and knowledge. *Minerva Gastroenterol Dietol* **2019**, *65* (4), 268-279.
333. Smits, L. P.; Bouter, K. E.; de Vos, W. M.; Borody, T. J.; Nieuwdorp, M., Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* **2013**, *145* (5), 946-53.
334. Vrieze, A.; Van Nood, E.; Holleman, F.; Salojärvi, J.; Kootte, R. S.; Bartelsman, J. F.; Dallinga-Thie, G. M.; Ackermans, M. T.; Serlie, M. J.; Oozeer, R.; Derrien, M.; Druesne, A.; Van Hylckama Vlieg, J. E.; Bloks, V. W.; Groen, A. K.; Heilig, H. G.; Zoetendal, E. G.; Stroes, E. S.; de Vos, W. M.; Hoekstra, J. B.; Nieuwdorp, M., Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* **2012**, *143* (4), 913-6.e7.
335. Kelly, C. R.; Kahn, S.; Kashyap, P.; Laine, L.; Rubin, D.; Atreja, A.; Moore, T.; Wu, G., Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* **2015**, *149* (1), 223-37.
336. de Groot, P. F.; Frissen, M. N.; de Clercq, N. C.; Nieuwdorp, M., Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes* **2017**, *8* (3), 253-267.
337. Thaiss, C. A.; Elinav, E., The remedy within: will the microbiome fulfill its therapeutic promise? *J Mol Med (Berl)* **2017**, *95* (10), 1021-1027.
338. Ferrere, G.; Wrzosek, L.; Cailleux, F.; Turpin, W.; Puchois, V.; Spatz, M.; Ciocan, D.; Rainteau, D.; Humbert, L.; Hugot, C.; Gaudin, F.; Noordine, M. L.; Robert, V.; Berrebi, D.; Thomas, M.; Naveau, S.; Perlemuter, G.; Cassard, A. M., Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice. *J Hepatol* **2017**, *66* (4), 806-815.
339. Seyrig, J. A.; Naveau, S.; Gonzales, R.; Petit, R., [Pectins. Present state of knowledge]. *Gastroenterol Clin Biol* **1983**, *7* (12), 1031-7.
340. Perumpail, B. J.; Li, A. A.; John, N.; Sallam, S.; Shah, N. D.; Kwong, W.; Cholankeril, G.; Kim, D.; Ahmed, A., The Therapeutic Implications of the Gut Microbiome and Probiotics in Patients with NAFLD. *Diseases* **2019**, *7* (1).
341. Worthmann, A.; John, C.; Rühlemann, M. C.; Baguhl, M.; Heinsen, F. A.; Schaltenberg, N.; Heine, M.; Schlein, C.; Evangelakos, I.; Mineo, C.; Fischer, M.; Dandri, M.; Kremoser, C.; Scheja, L.; Franke, A.; Shaul, P. W.; Heeren, J., Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nat Med* **2017**, *23* (7), 839-849.
342. Tolhurst, G.; Heffron, H.; Lam, Y. S.; Parker, H. E.; Habib, A. M.; Diakogiannaki, E.; Cameron, J.; Grosse, J.; Reimann, F.; Gribble, F. M., Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* **2012**, *61* (2), 364-71.
343. Lehmann, A.; Hornby, P. J., Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2016**, *310* (11), G887-98.
344. Oguma, T.; Nakayama, K.; Kuriyama, C.; Matsushita, Y.; Yoshida, K.; Hikida, K.; Obokata, N.; Tsuda-Tsukimoto, M.; Saito, A.; Arakawa, K.; Ueta, K.; Shiotani, M., Intestinal Sodium Glucose

- Cotransporter 1 Inhibition Enhances Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Normal and Diabetic Rodents. *J Pharmacol Exp Ther* **2015**, 354 (3), 279-89.
345. Song, P.; Onishi, A.; Koepsell, H.; Vallon, V., Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets* **2016**, 20 (9), 1109-25.
346. Li, T. P.; Zhu, R. G.; Dong, Y. P.; Liu, Y. H.; Li, S. H.; Chen, G., Effects of pectin pentaoligosaccharide from Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. Major) on the activity and mRNA levels of enzymes involved in fatty acid oxidation in the liver of mice fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem* **2013**, 61 (31), 7599-605.
347. Bray, J. K.; Chiu, G. S.; McNeil, L. K.; Moon, M. L.; Wall, R.; Towers, A. E.; Freund, G. G., Switching from a high-fat cellulose diet to a high-fat pectin diet reverses certain obesity-related morbidities. *Nutr Metab (Lond)* **2018**, 15, 55.
348. Wu, J.; Chen, M.; Shi, S.; Wang, H.; Li, N.; Su, J.; Liu, R.; Huang, Z.; Jin, H.; Ji, X.; Wang, S., Hypoglycemic effect and mechanism of a pectic polysaccharide with hexenuronic acid from the fruits of *Ficus pumila* L. in C57BL/KsJ db/db mice. *Carbohydr Polym* **2017**, 178, 209-220.
349. Reynés, B.; Palou, M.; Rodríguez, A. M.; Palou, A., Regulation of Adaptive Thermogenesis and Browning by Prebiotics and Postbiotics. *Front Physiol* **2018**, 9, 1908.
350. Weitkunat, K.; Stuhlmann, C.; Postel, A.; Rumberger, S.; Fankhanel, M.; Woting, A.; Petzke, K. J.; Gohlke, S.; Schulz, T. J.; Blaut, M.; Klaus, S.; Schumann, S., Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 6109.
351. Moreno-Navarrete, J. M.; Serino, M.; Blasco-Baque, V.; Azalbert, V.; Barton, R. H.; Cardellini, M.; Latorre, J.; Ortega, F.; Sabater-Masdeu, M.; Burcelin, R.; Dumas, M. E.; Ricart, W.; Federici, M.; Fernández-Real, J. M., Gut Microbiota Interacts with Markers of Adipose Tissue Browning, Insulin Action and Plasma Acetate in Morbid Obesity. *Mol Nutr Food Res* **2018**, 62 (3).
352. Li, Z.; Yi, C. X.; Katiraei, S.; Kooijman, S.; Zhou, E.; Chung, C. K.; Gao, Y.; van den Heuvel, J. K.; Meijer, O. C.; Berbee, J. F. P.; Heijink, M.; Giera, M.; Willems van Dijk, K.; Groen, A. K.; Rensen, P. C. N.; Wang, Y., Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut* **2018**, 67 (7), 1269-1279.
353. Gao, Z.; Yin, J.; Zhang, J.; Ward, R. E.; Martin, R. J.; Lefevre, M.; Cefalu, W. T.; Ye, J., Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **2009**, 58 (7), 1509-17.
354. Garcia-Carrizo, F.; Cannon, B.; Nedergaard, J.; Pico, C.; Dols, A.; Rodriguez, A. M.; Palou, A., Regulation of thermogenic capacity in brown and white adipocytes by the prebiotic high-esterified pectin and its postbiotic acetate. *Int J Obes (Lond)* **2020**, 44 (3), 715-726.
355. Le Roy, T.; Llopis, M.; Lepage, P.; Bruneau, A.; Rabot, S.; Bevilacqua, C.; Martin, P.; Philippe, C.; Walker, F.; Bado, A.; Perlemuter, G.; Cassard-Doulcier, A. M.; Gerard, P., Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* **2013**, 62 (12), 1787-94.
356. Newgard, C. B., Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab* **2012**, 15 (5), 606-14.
357. Han, J. H.; Kim, I. S.; Jung, S. H.; Lee, S. G.; Son, H. Y.; Myung, C. S., The effects of propionate and valerate on insulin responsiveness for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes via G protein-coupled receptor 41. *PLoS One* **2014**, 9 (4), e95268.
358. Gart, E.; Souto Lima, E.; Schuren, F.; de Ruiter, C. G. F.; Attema, J.; Verschuren, L.; Keijer, J.; Salic, K.; Morrison, M. C.; Kleemann, R., Diet-Independent Correlations between Bacteria and Dysfunction of Gut, Adipose Tissue, and Liver: A Comprehensive Microbiota Analysis in Feces and Mucosa of the Ileum and Colon in Obese Mice with NAFLD. *Int J Mol Sci* **2018**, 20 (1).
359. Singh, V.; Yeoh, B. S.; Chassaing, B.; Xiao, X.; Saha, P.; Aguilera Olvera, R.; Lapek, J. D.; Zhang, L.; Wang, W. B.; Hao, S.; Flythe, M. D.; Gonzalez, D. J.; Cani, P. D.; Conejo-Garcia, J. R.; Xiong, N.; Kennett, M. J.; Joe, B.; Patterson, A. D.; Gewirtz, A. T.; Vijay-Kumar, M., Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer. *Cell* **2018**, 175 (3), 679-694.e22.

360. Makki, K.; Deehan, E. C.; Walter, J.; Backhed, F., The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, *23* (6), 705-715.
361. den Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D. J.; Bakker, B. M., The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* **2013**, *54* (9), 2325-40.
362. Liu, H. Y.; Walden, T. B.; Cai, D.; Ahl, D.; Bertilsson, S.; Phillipson, M.; Nyman, M.; Holm, L., Dietary Fiber in Bilberry Ameliorates Pre-Obesity Events in Rats by Regulating Lipid Depot, Cecal Short-Chain Fatty Acid Formation and Microbiota Composition. *Nutrients* **2019**, *11* (6).
363. Natividad, J. M.; Agus, A.; Planchais, J.; Lamas, B.; Jarry, A. C.; Martin, R.; Michel, M. L.; Chong-Nguyen, C.; Roussel, R.; Straube, M.; Jegou, S.; McQuitty, C.; Le Gall, M.; da Costa, G.; Lecornet, E.; Michaudel, C.; Modoux, M.; Glodt, J.; Bridonneau, C.; Sovran, B.; Dupraz, L.; Bado, A.; Richard, M. L.; Langella, P.; Hansel, B.; Launay, J. M.; Xavier, R. J.; Duboc, H.; Sokol, H., Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab* **2018**, *28* (5), 737-749.e4.
364. Laurans, L.; Venteclef, N.; Haddad, Y.; Chajadine, M.; Alzaid, F.; Metghalchi, S.; Sovran, B.; Denis, R. G. P.; Dairou, J.; Cardellini, M.; Moreno-Navarrete, J. M.; Straub, M.; Jegou, S.; McQuitty, C.; Viel, T.; Esposito, B.; Tavitian, B.; Callebert, J.; Luquet, S. H.; Federici, M.; Fernandez-Real, J. M.; Burcelin, R.; Launay, J. M.; Tedgui, A.; Mallat, Z.; Sokol, H.; Taleb, S., Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health. *Nat Med* **2018**, *24* (8), 1113-1120.
365. Nagata, N.; Xu, L.; Kohno, S.; Ushida, Y.; Aoki, Y.; Umeda, R.; Fuke, N.; Zhuge, F.; Ni, Y.; Nagashimada, M.; Takahashi, C.; Suganuma, H.; Kaneko, S.; Ota, T., Glucoraphanin Ameliorates Obesity and Insulin Resistance Through Adipose Tissue Browning and Reduction of Metabolic Endotoxemia in Mice. *Diabetes* **2017**, *66* (5), 1222-1236.
366. Okla, M.; Wang, W.; Kang, I.; Pashaj, A.; Carr, T.; Chung, S., Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) attenuates adaptive thermogenesis via endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **2015**, *290* (44), 26476-90.
367. Campbell, C. L.; Yu, R.; Li, F.; Zhou, Q.; Chen, D.; Qi, C.; Yin, Y.; Sun, J., Modulation of fat metabolism and gut microbiota by resveratrol on high-fat diet-induced obese mice. *Diabetes Metab Syndr Obes* **2019**, *12*, 97-107.
368. Zhao, L.; Zhang, Q.; Ma, W.; Tian, F.; Shen, H.; Zhou, M., A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. *Food Funct* **2017**, *8* (12), 4644-4656.
369. Yang, C.; Deng, Q.; Xu, J.; Wang, X.; Hu, C.; Tang, H.; Huang, F., Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats. *Food Res Int* **2019**, *116*, 1202-1211.
370. Castaño-Rodríguez, N.; Mitchell, H. M.; Kaakoush, N. O., NAFLD, Helicobacter species and the intestinal microbiome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2017**, *31* (6), 657-668.
371. Singh, V.; Vijay-Kumar, M., Beneficial and detrimental effects of processed dietary fibers on intestinal and liver health: health benefits of refined dietary fibers need to be redefined! *Gastroenterol Rep (Oxf)* **2020**, *8* (2), 85-89.
372. Gallage, S.; Kotsiliti, E.; Heikenwalder, M., When Soluble Fibers Meet Hepatocellular Carcinoma: The Dark Side of Fermentation. *Cell Metab* **2018**, *28* (5), 673-675.
373. Ajouz, H.; Mukherji, D.; Shamseddine, A., Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol* **2014**, *12*, 164.
374. Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C. G., Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72* (3), 1729-38.
375. Meslier, V.; Laiola, M.; Roager, H. M.; De Filippis, F.; Roume, H.; Quinquis, B.; Giacco, R.; Mennella, I.; Ferracane, R.; Pons, N.; Pasolli, E.; Rivellese, A.; Dragsted, L. O.; Vitaglione, P.; Ehrlich, S. D.; Ercolini, D., Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake. *Gut* **2020**, *69* (7), 1258-1268.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

376. Cani, P. D.; Van Hul, M., Mediterranean diet, gut microbiota and health: when age and calories do not add up! *Gut* **2020**, *69* (7), 1167-1168.

Titre : Implication du microbiote intestinal et de la pectine dans la stéato-hépatite non-alcoolique

Mots clés : microbiote intestinal, pectine, NAFLD , obésité, syndrome métabolique, tissu adipeux

Résumé : La stéatopathie non alcoolique (NAFLD) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Elle suit l'épidémie d'obésité et affecte un quart de la population mondiale. Son évolution croissante en fait un enjeu sociétal majeur tant d'un point de vue de santé publique que par l'impact économique qu'elle engendre. Actuellement, aucune thérapeutique n'est spécifiquement approuvée pour le traitement de la NAFLD. L'urgence est donc à la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD dans l'optique de développer des solutions thérapeutiques optimales. Le microbiote intestinal est un cofacteur primordial de la pathogenèse de la NAFLD et intervient dans la susceptibilité individuelle à la maladie. Le microbiote intestinal peut notamment être modulé par les fibres alimentaires telles que la pectine considérée comme prébiotique. L'objectif de ce travail était dans un premier temps d'asseoir les liens entre microbiote intestinal, pectine et l'impact sur les acteurs de la NAFLD dont le foie et les tissus adipeux.

Dans un deuxième temps nous souhaitons évaluer si la modification du microbiote intestinal par la pectine suffisait à améliorer et restaurer les lésions hépatiques induites par un régime gras dans un modèle murin de NAFLD. A faible dose, une supplémentation en pectine atténue les lésions délétères induites par un régime gras chez la souris. L'effet protecteur de la pectine est liée à une modulation du microbiote. Cette modification impacte les fonctionnalités des tissus adipeux via la libération de métabolites bactériens dont les acides gras à chaîne courte (AAGC).

Ce travail de thèse montre que le microbiote intestinal et ses métabolites sont une cible thérapeutique potentielle dans la stéatose hépatique non-alcoolique. L'utilisation des AAGC couplé à l'utilisation de probiotiques pourraient s'avérer des pistes intéressantes chez l'homme et ce en association avec des mesures diététiques visant à réintroduire des fibres alimentaires au sein du régime.

Title : Intestinal microbiota and pectin in non-alcoholic steatohepatitis

Keywords : intestinal microbiota, pectin, NAFLD, obesity, metabolic syndrome, adipose tissue

Abstract : Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) corresponds to the hepatic manifestation of the metabolic syndrome and affects a quarter of general population which leads to dramatic economic and health issues. So far, no approved pharmacotherapy is available for NAFLD. Among overweighted/obese patients, only a subset of individuals will develop severe liver lesions. It has been demonstrated that intestinal microbiota plays a major role in the individual susceptibility of patients to develop NAFLD. The Western-style diet, enriched in fat and sugar and low in fibers contribute at least in part to depletion of specific bacterial taxa in the IM.

Thus, if the establishment of a bacterial signature in NAFLD is important for the follow-up of patients, change the IM to restore a "healthy" IM could be relevant. Indeed, impact of dietary fiber on gut microbiota is clearly established. It has been shown that fibers prevent liver injury depending of the type of fiber.

In the current study, we addressed the role of fiber in the prevention of liver injury during a diet induced obesity (DIO) by adding fiber in a high fat diet (HFD). Then, we studied the role of IM in the protective effect of pectin in DIO mice. To this end, the IM from DIO mice treated with pectin was transplanted in DIO mice both before or after the development of obesity. Moreover, we analyzed the effect of the addition of pectin in a HFD pectin after the establishment of obesity. We were able to confirm the beneficial role of pectin in the pathogenesis of NAFLD. Pectin supplementation modulates intestinal microbiota composition and bacterial metabolites like short-chain fatty acids (SCFAs). Together, this actors influence the functionality of white and brown adipose tissues. In the future, the use of bacterial metabolites as SCFAs and specific probiotics could be proposed in the management of NAFLD in addition to dietary measures with fibers supplementation.